

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Effets des facteurs de croissance sur la maturation in vitro d'ovocytes ovins

Gaspard, Olivier

*Award date:*  
1999

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**EFFETS DES FACTEURS DE CROISSANCE SUR  
LA MATURATION IN VITRO D'OVOCYTES OVINS**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de  
Licencié en Sciences biologiques**

Olivier GASPARD

Juin 1999



**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: +32(0)81.72.44.18 - Téléfax: +32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **Effets des facteurs de croissance sur la maturation in vitro d'ovocytes ovins**

GASPARD Olivier

### Résumé

Pour les cultures cellulaires, il est habituel de recourir à diverses solutions non définies d'origine animale. A titre d'exemple, le sérum de veau foetal est utilisé pour la culture de différentes cellules somatiques, le fluide folliculaire, pour la culture d'ovocytes, ou encore le sérum de brebis en chaleur ou de vache superovulée. L'étude des facteurs de croissance, qui sont parmi les constituants les plus actifs de ces solutions, devrait permettre d'élaborer des solutions définies pour remplacer les sérums ou le fluide folliculaire et d'éliminer ainsi les problèmes liés à l'utilisation d'un liquide corporel.

Les effets des IGF-I et -II, du bFGF et de l'EGF sur la maturation ovocytaire in vitro (MIV) d'ovocytes ovins ont été étudiés dans ce travail. Leurs actions sur le taux de maturation des ovocytes et sur la stéroïdogenèse des cellules du cumulus ont été quantifiées, après mise au point de divers aspects des techniques d'expérimentation (récupération des ovocytes, maturation in vitro, capacitation du sperme).

La maturation ovocytaire in vitro n'est possible qu'en présence de FSH. Elle est fortement stimulée par le fluide folliculaire et dans une même mesure par l'IGF-I et l'EGF. L'IGF-II et le bFGF sont moins efficaces. L'IGF-I, non les autres facteurs, permet de renforcer l'effet du fluide folliculaire.

En absence de fluide folliculaire la production d'œstradiol est basse. Elle est faiblement, mais significativement augmentée par IGF-I, non par les autres facteurs. Le fluide folliculaire est sur ce point nettement plus actif que les facteurs de croissance.

Des expériences ultérieures détermineront l'effet des facteurs de croissance étudiés, ou d'autres, utilisés lors de la MIV sur la compétence des ovocytes à développer des embryons et le rôle de ces facteurs dans les étapes successives de la FIVETE.

Mémoire de licence en Sciences biologiques  
Juin 1999

**Promoteur:** R. Paquay

**Co-promoteur:** J.-L. Bister

*Tout d'abord, je tiens à remercier mes parents pour tout le soutien qu'il m'ont apporté durant ce semestre.*

*Merci bien sûr au Prof. R. Paquay, mon promoteur, pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire, et pour son aide et ses conseils avisés. Merci au Dr. J.-L. Bister pour m'avoir suivi tout au long de mon travail et pour avoir donné réponse à mes nombreuses questions de chercheur débutant.*

*Merci aussi à tous les membres du labo, et plus particulièrement à Robert pour son écoute, et à Marie-Antoinette et à Bénédicte pour leur sympathie. Enfin, en vrac, merci à Marianne (du CISO) pour son aide lors des prélèvements, à Yves Cognié (de l'INRA) pour ses explications sur la FIVETE et à Kataline (du laboratoire de BMS) pour m'avoir guidé dans l'analyse statistique.*

*Merci à eux et à tous les autres pour avoir contribué à la réalisation de ce mémoire...*



## Liste des abréviations

Pour faciliter la lecture du travail qui suit, voici une liste des abréviations utilisées :

Abréviation	Signification
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
aFGF	Forme acide du facteur de croissance des fibroblastes
AIGF	Facteur de croissance induit par les androgènes
AMH	Hormone antimüllérienne
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
bFGF	Forme basique du facteur de croissance des fibroblastes
bGCP-2	Protéine chémoattractique des granulocytes bovins
BP	Protéine liant...
BSA	Albumine bovine sérique
CISO	Centre d'insémination et de sélection ovine
COC	Complexe ovocyte-cumulus
COX	Cyclooxygénase
cPLA2	Phospholipase A2 cytosolique
CSF	Facteur stimulant les colonies
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif
DBB	Dilueur de sperme de bouc et de bélier
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme
EPO	Erythropoïétine
FCS	Sérum de veau fœtal
FF	Fluide folliculaire
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FIV	Fécondation in vitro
FIVETE	Fécondation in vitro et transfert d'embryons
FSH	Hormone stimulant les follicules
G-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes
GDF	Facteur de croissance et de différenciation
GF	Facteur de croissance
GF-R	Récepteur du facteur de croissance
GH	Hormone de croissance
GH-BP	Protéine liant l'hormone de croissance
GHRH	Hormone stimulant la sécrétion d'hormone de croissance
GHRP	Protéine stimulant la sécrétion d'hormone de croissance
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
HB-EGF	Facteur de croissance de l'épiderme liant l'héparine
HBGF	Facteur de croissance liant l'héparine

## Liste des abréviations

hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
hMG	Gonadotrophine ménopausique humaine
ICSI	Injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde
IFN	Interféron
IGF	Facteur de croissance de type insuline
IGF-BP	Protéine liant les facteurs de croissance de type insuline
IL	Interleukine
KGF	Facteur de croissance des kératinocytes
KL	Ligand du récepteur kit (appelé aussi SCF)
LH	Hormone lutéinisante
MAPK	Protéine kinase activée par un mitogène
M-CSF	Facteur stimulant les colonies de macrophages
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	Kinase des protéines kinases activées par un mitogène
MGF	Facteur de croissance des mastocytes
MIV	Maturation in vitro
NGF	Facteur de croissance des nerfs
NT	Neurotrophine
OPU	Pick-up ovocytaire (récolte des ovocytes)
PD-ECGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PG	Prostaglandine
PGFS	Synthase des prostaglandines F
PKC	Protéine kinase C
PL	Lactogène placentaire
PIGF	Facteur de croissance du placenta
PMSG	Gonadotrophine sérique de jument gestante
R	Récepteur
SCF	Facteur des cellules souches (ou KL)
SOF	Fluide oviducal synthétique
TCM	Milieu de culture tissulaire
TGF	Facteur de croissance transformant
TIC	Cellule interstitielle de la thèque
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TNF	Facteur de nécrose des tumeurs
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire



# TABLE DES MATIERES



<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
I. Intérêt de la recherche	2
II. Présentation du travail	2
<b>PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre I : L'hormone et les facteurs de croissance</b>	<b>5</b>
I. L'hormone de croissance	5
1. Mode d'action de l'hormone de croissance	5
1.1. Actions directes et indirectes de l'hormone de croissance	5
1.2. Récepteur et protéine liant la GH	6
2. Contrôles de la synthèse et de la sécrétion de la GH	6
3. Effets de la GH	7
II. Les facteurs de croissance	7
1. Les somatomédines ou IGF	8
1.1. Récepteurs aux IGF	8
1.2. Protéines liant les IGF	8
1.3. Régulation des IGF hépatiques	9
1.4. Actions générales des IGF	9
2. Les EGF	10
2.1. Les membres de la famille EGF	10
2.2. Structure et fonctions	10
3. Les FGF ou GF liant l'héparine	11
3.1. Découverte et formes existantes	11
3.2. Récepteurs aux FGF	11
3.3. Effets des FGF	12
4. Les PDGF	12
4.1. Découverte et formes existantes	12
4.2. Récepteurs aux PDGF	13
4.3. Rôle des PDGF dans la croissance cellulaire	13
5. Les TGF $\beta$	13
5.1. Les différents TGF $\beta$	13
5.2. Récepteurs aux TGF $\beta$	14
5.3. Rôles des TGF $\beta$	14
5.4. Autres membres homologues de la famille des TGF $\beta$	15
6. Les facteurs de croissance spécifiques	15
6.1. Le facteur de croissance des nerfs	15
6.2. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	16
6.3. Le facteur de croissance des hépatocytes	17
6.4. L'érythropoïétine	18
6.5. Les facteurs stimulant les colonies (CSF)	19
6.6. Le facteur de nécrose des tumeurs	19
6.7. Le facteur des cellules souches	20

6.8. Les interférons	20
<b>Chapitre II : L'hormone et les facteurs de croissance dans la reproduction</b>	<b>22</b>
I. Dans l'ovaire	22
1. Dans le follicule	22
1.1. Lieux de synthèse des facteurs de croissance	22
1.2. Développement et métabolisme du follicule	22
1.2.1. La GH	23
1.2.2. Les IGF	24
1.2.3. Les TGF $\beta$	24
1.2.4. Les facteurs de croissance spécifiques	25
1.3. Croissance folliculaire : atresie et dominance	25
1.3.1. L'action des IGF et des IGFBP	26
1.3.2. Les actions des autres facteurs de croissance	26
2. Dans le corps jaune	27
II. Dans la nidation, la placentation et le développement embryonnaire	28
1. Dans le développement embryonnaire	28
1.1. Les IGF	28
1.2. Les EGF	28
1.3. Les PDGF	28
1.4. Les FGF	28
1.5. Les facteurs de croissance spécifiques	29
2. Dans la nidation, la placentation et la gestation	29
2.1. Les IGF	29
2.2. Les EGF	29
2.3. Les TGF $\beta$	30
2.4. Les FGF	30
2.5. L'interféron $\tau$	31
2.6. Les facteurs de croissance spécifiques	32
<b>Chapitre III : La FIVETE (Fécondation In Vitro et Transfert d'Embryons)</b>	<b>33</b>
I. La FIVETE	33
1. La récolte des gamètes	33
1.1. Les spermatozoïdes	33
1.2. Les ovocytes	33
1.2.1. Chez la femme	34
1.2.2. Chez les animaux	34
2. La maturation ovocytaire in vitro	35
3. La capacitation des spermatozoïdes	35
4. La fécondation in vitro	36
5. La fécondation assistée	36
5.1. Dépellucidation totale	37
5.2. Dépellucidation partielle	37



5.3. Injection intracytoplasmique du spermatozoïde	37
5.4. Injection sous la zone pellucide du spermatozoïde	37
6. Le développement embryonnaire	38
7. Le transfert d'embryons in utero	38
<b>Chapitre IV : L'hormone et les facteurs de croissance dans la FIVETE</b>	<b>39</b>
I. Dans la maturation in vitro	39
II. Dans la fécondation in vitro	40
III. Dans le développement embryonnaire	40
<b>DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE</b>	<b>42</b>
I. Maturation in vitro	43
1. Synthèse des différents milieux	43
2. Récolte des ovocytes	44
3. Traitement et mise en maturation des ovocytes	45
3.1. Les différents milieux de maturation	45
3.2. Traitement des ovocytes et mise en maturation	45
II. Récolte et capacitation des spermatozoïdes	46
1. Synthèse des différents milieux	46
2. Récolte du sperme	48
3. Traitement et capacitation des spermatozoïdes	49
3.1. Centrifugation sur gradient de percoll	49
3.2. Swim-up	50
3.3. Centrifugations de lavage du sperme frais	50
III. Fécondation in vitro	51
1. Synthèse des différents milieux	51
2. Traitement des COC et fécondation	51
IV. Observation des gamètes	52
1. Liste des produits utilisés	52
2. Méthodes d'observation	52
2.1. Sans coloration	52
2.2. Avec une coloration au fluorochrome de Hoechst	53
V. Dosage de l'œstradiol en R.I.A.	53
1. Principes du test	53
2. Réactifs et solutions	53
3. Méthode pour le dosage	54
4. Calcul des résultats	55
VI. Analyse statistique des résultats	55
1. Résultats des maturations	55
2. Résultats du dosage de l'œstradiol	57
<b>TROISIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL</b>	<b>58</b>
<b>CHAPITRE I : MISE AU POINT DES TECHNIQUES</b>	<b>59</b>
I. Récupération des ovocytes	59



1. De l'abattoir au laboratoire	59
2. Ponction des follicules	59
II. Maturation des ovocytes	60
III. Capacitation des spermatozoïdes	61
1. Méthode du gradient de percoll	61
2. Méthode du swim-up	61
3. Utilisation du sperme frais	62
3.1. Essai 1	63
3.1.1. Tube test numéro 1	63
3.1.2. Tube test numéro 2	64
3.1.3. Tube test numéro 3	64
3.1.4. Tube test numéro 4	64
3.2. Essai 2	64
3.3. Conclusion	65
<b>CHAPITRE II : RESULTATS EXPERIMENTAUX</b>	<b>66</b>
I. Maturations	66
1. Taux de maturation	66
1.1. Rappels préliminaires	66
1.2. Expérience 1	66
1.3. Expérience 2	67
1.4. Expériences 3, 4, 5 et 6	68
2. Analyse statistique	70
2.1. Présentation des analyses	70
2.2. Résultats pour les données brutes	70
2.2.1. Test de Hartley et ANOVA	70
2.2.2. Tests de Student	71
2.3. Résultats pour les données sans valeurs erratiques	72
2.2.1. Test de Hartley et ANOVA	72
2.2.2. Tests de Student	72
3. Conclusions	74
II. Fécondations	74
III. Production d'œstradiol	74
1. Concentrations	74
2. Analyse statistique	75
3.1. Test de Hartley et ANOVA	75
3.2. Tests de Student	75
3. Conclusions	77
<b>QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION DES RESULTATS</b>	<b>78</b>
I. Maturations	79
II. Production d'œstradiol	81
III. Comparaison des effets sur la maturation et sur la production d'oest.	83

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	84
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87



# INTRODUCTION



## **I. INTERET ET BUT DE LA RECHERCHE.**

De nombreuses expérimentations en biologie nécessitent des cultures de cellules. Ces cultures se font grâce à un milieu de culture contenant divers sels et différentes matières nutritives. Elles nécessitent souvent des facteurs de croissance et autres cytokines pour stimuler la division, la croissance, la différenciation et l'activité des cellules. C'est pourquoi on ajoute en général un liquide corporel dans le milieu de culture : sérum de veau fœtal pour des cellules somatiques, fluide folliculaire pour les ovocytes en maturation, sérum de brebis en chaleur pour les ovocytes en fécondation.

Si ces liquides sont intéressants pour leur richesse en facteurs de croissance et en hormones, ils posent cependant divers problèmes liés à leur origine animale : milieu mal défini et donc variable, possibilités plus grandes de contamination, ... C'est pourquoi différentes études ont été entreprises pour remplacer ces solutions par des milieux définis. Ainsi, on essaie de déterminer la composition du fluide folliculaire, du sérum de brebis en chaleur, et l'on teste des facteurs de croissance et des hormones pour voir si leurs effets sur les cultures cellulaires permettraient de remplacer les milieux non définis.

Le but de ce mémoire est d'étudier l'effet des facteurs de croissance (GF) sur la maturation ovocytaire in vitro (MIV) dans le but de remplacer ultérieurement le fluide folliculaire utilisé en MIV par un cocktail de GF. Nous testerons dans ce but les effets des IGF-I et -II, du bFGF et de l'EGF. Ces effets seront quantifiés par la mesure des taux de maturation et de la production d'œstradiol en présence ou en absence du GF étudié. L'absence ou la présence du fluide folliculaire dans les milieux testés devrait alors permettre d'évaluer respectivement l'effet du facteur de croissance seul et l'existence d'un effet additif du facteur de croissance avec le fluide folliculaire.

## **II. PRESENTATION DU TRAVAIL.**

Dans une première partie, une revue bibliographique sur le sujet a été réalisée. Le premier chapitre propose une revue assez générale des différents facteurs de croissance connus : on peut y trouver leurs caractéristiques structurales et biochimiques, la régulation de leur expression et de leur sécrétion, les différentes formes existantes, leurs récepteurs et leurs effets au niveau de quelques tissus. Le deuxième chapitre explique plus en détail les effets de ces facteurs de croissance au niveau du système reproducteur et plus particulièrement dans les ovaires et dans l'utérus. Le chapitre trois expose la technique de FIVETE (Fécondation In Vitro et Transfert d'Embryons) et le chapitre quatre résume les connaissances acquises au point de vue de l'utilisation des facteurs de croissance dans cette technique.

La deuxième partie du travail décrit le matériel et les méthodes utilisés pour les expériences réalisées dans ce travail. On y trouve ainsi les techniques mises en œuvre pour la maturation in vitro, la capacitation des spermatozoïdes, la fécondation in vitro et le dosage de l'œstradiol.

La troisième partie expose la mise au point préalable de certaines techniques puis les résultats des expériences réalisées

Enfin, dans la quatrième partie, la discussion de ces résultats expérimentaux est réalisée, et les conclusions et les perspectives sont définies.



PREMIERE PARTIE :

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE



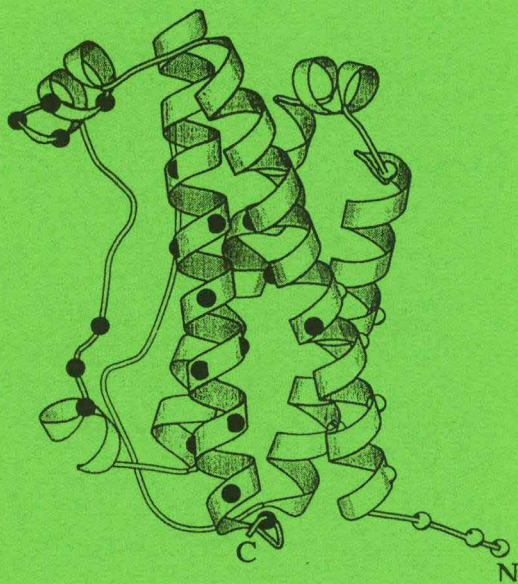


Figure 1 : Structure de la GH humaine (hGH ; in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).



## **CHAPITRE I :** **L'HORMONE ET LES FACTEURS DE CROISSANCE.**

### **I. L'HORMONE DE CROISSANCE.**

#### **1. Mode d'action.**

##### **1.1. Actions directes et indirectes.**

L'hormone de croissance (GH pour Growth Hormone ; *figure 1*) et la prolactine définissent une famille d'environ 22 facteurs de croissance reprenant notamment les lactogènes placentaires (PLs), les proliférines et la somatolactine. C'est aussi l'hormone la plus abondante dans la glande pituitaire humaine qui joue le rôle primaire de contrôle de la croissance postnatale. Elle possède deux grands types d'effets. Premièrement des effets - de type insuline - de stimulation de la croissance des tissus musculaires et squelettiques, et deuxièmement des effets - opposés à ceux de l'insuline- lipolytiques ainsi que sur le métabolisme des carbohydrates dans le tissu adipeux.

En 1957, Salmon et Daughaday ont proposé une explication selon laquelle l'hormone de croissance agit par l'intermédiaire de facteurs présents dans le sérum. Les principaux d'entre eux sont les somatomédines, appelées aussi Insuline-like Growth Factors ou IGF. Il existe deux IGF appelées IGF-I (somatomédine-C) et IGF-II, l'IGF-I étant beaucoup plus dépendant de la GH que l'IGF-II. Ces facteurs de croissance peuvent être synthétisés par le foie dans le cadre des effets de la GH et ont ainsi des actions de type endocrine mais ils sont aussi synthétisés dans toute une série de tissus où ils possèdent alors des actions paracrines et/ou autocrines.

Les actions de la GH chez l'animal vivant peuvent donc être classées comme directes ou indirectes. Les actions directes sont celles sur le métabolisme des lipides et du tissu adipeux qui sont en synergie avec le cortisol et opposées aux actions de l'insuline et des somatomédines. Les actions indirectes anaboliques et sur la stimulation de la croissance de la GH sont médiées par les somatomédines, et incluent la prolifération cellulaire et la synthèse protéique aussi bien dans les tissus squelettiques que non squelettiques (Williams, 1992).



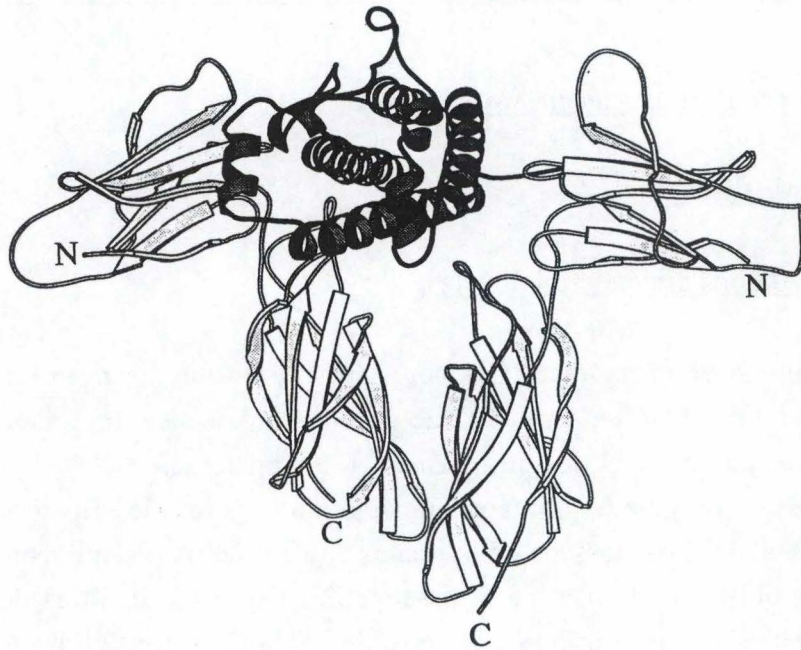


Figure 2 : Structure du complexe hGH-(hGHBP)<sub>2</sub> (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

### 1.2. Récepteur et protéine liant la GH.

Le récepteur à la GH (GH-R) est présent dans de nombreux tissus (dont les compartiments ovariens) et les cellules l'exprimant le plus sont les hépatocytes et les adipocytes (Kelly et al., 1993).

Il existe aussi une forme raccourcie et soluble de ce récepteur constituée du domaine extracellulaire du GH-R (Chez le lapin : Ymer et Herington, 1985 ; chez l'homme : Baumann et al., 1986) appelée protéine liant la GH (GH-BP pour GH-Binding Protein ; *figure 2*) présente entre autres dans le sérum ovin (Amit et al., 1992 ; Bingham et al., 1994). Les rôles de cette GH-BP sont multiples. Tout d'abord, elle protège l'hormone de la dégradation par formation du complexe hormone-BP (Postel-Vinay et al., 1995) et permet ainsi la constitution d'un réservoir circulant de GH. Ensuite, elle empêcherait, suite à la liaison de l'hormone à son récepteur, l'internalisation et la dégradation intracellulaire du complexe hormone-récepteur (Baumann, 1993 ; Herington et al., 1994 ; Postel-Vinay, 1996). Enfin, la GH-BP pourrait soit empêcher la liaison hormone-récepteur par inhibition compétitive ou alors la faciliter et favoriser ainsi l'action biologique de la GH (Bick et al., 1992).

Au niveau de la régulation du GH-R et de la GH-BP, on peut voir l'influence d'hormones telles la GH (Ilkbahar et al., 1995), la thyroxine et les glucocorticoïdes (Le Cam et Legraverend, 1993), l'œstradiol, l'insuline, la LH (Postel-Vinay et al., 1987 ; Kelly et al., 1993 ; Maes et al., 1995 ; Juengel et al., 1997) ou encore la testostérone (Baumbach et Bingham, 1995), mais aussi l'influence du stade de développement (Carlsson et al., 1993), de l'état physiologique, du sexe (Massa et al., 1990) ainsi que de l'alimentation de l'animal (chez l'ovin : Bauer et al., 1995).

## 2. Contrôles de la synthèse et de la sécrétion.

La GH est principalement synthétisée et sécrétée par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse, à partir du gène GH-N (Brown, 1994). Elle est aussi synthétisée sous une autre forme uniquement lors de la gestation, à partir du gène GH-V placentaire (Bauman, 1992). Elle est stockée dans des vésicules de sécrétion pouvant subir l'exocytose suite à une transduction du signal initiée par une interaction type hormone-récepteur.

Deux peptides hypothalamiques contrôlent la synthèse et la sécrétion de la GH (*figure 3*): La GHRH (GH-Releasing Hormone) stimulante pour la synthèse et la sécrétion, et la somatostatine (SS) inhibant la sécrétion (Kahn et al., 1992). Un troisième intervenant, la GHRP (GH-Releasing Protein), un hexapeptide dérivé des enképhalines, semble stimuler la sécrétion de la GH par une autre voie que la GHRH (Howard et al., 1996 ; Pong et al., 1996).



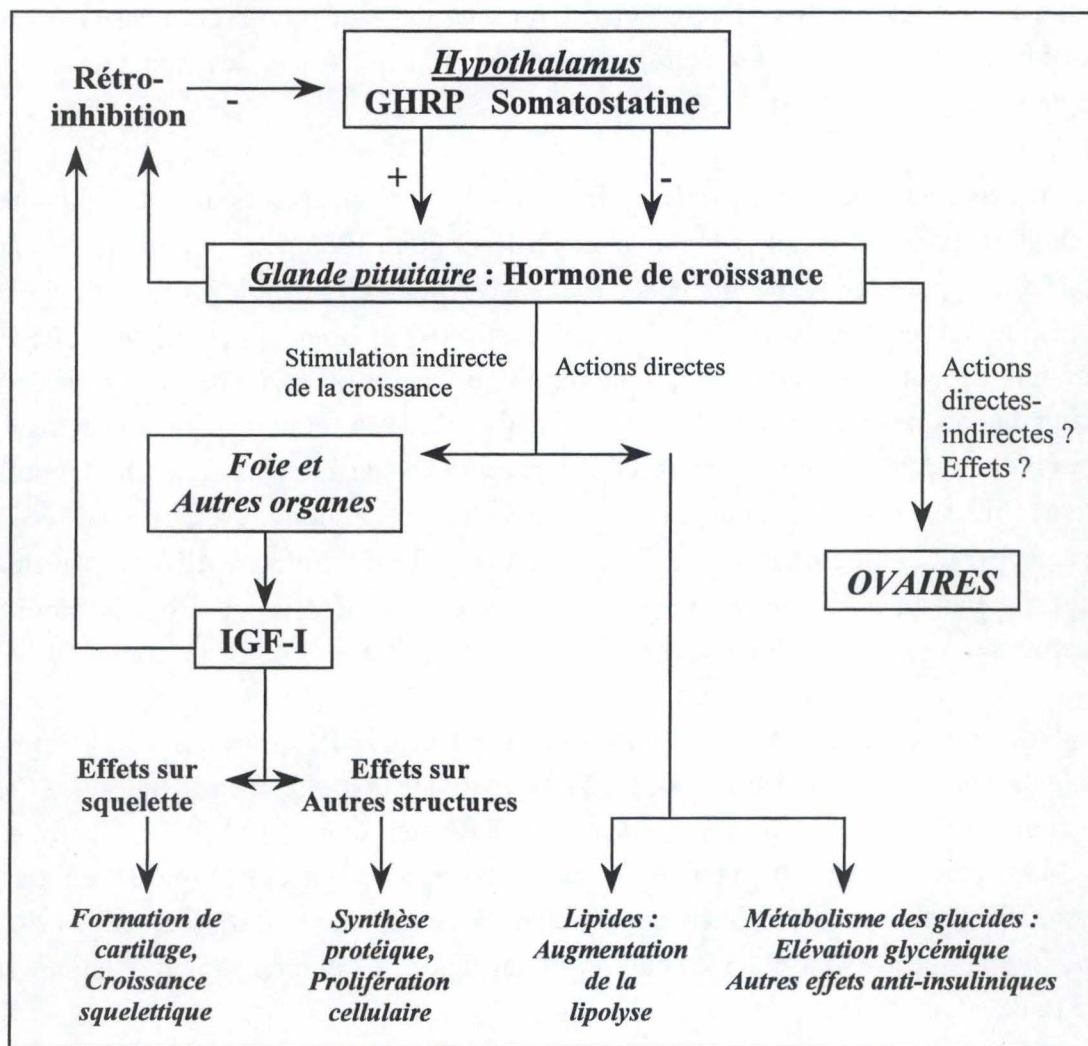


Figure 3 : présentation schématique des multiples sites d'action de la GH (Perrad, 1998).

Au niveau des facteurs endocriniens, il existe un « feed-back » de régulation faisant intervenir la GH, l'IGF-I, la GHRH et la SS. Au niveau pituitaire, l'IGF-I supprime l'émission basale de GH ainsi que son émission induite par la GHRH (Silverman et al., 1989) et diminue l'expression du gène de la GH (chez l'homme : Yamashita et al., 1986). Au niveau hypothalamique, l'IGF-I module la synthèse et/ou l'émission de GHRH et de SS, son mode d'action variant selon les espèces. On peut signaler en outre un contrôle exercé par l'insuline, les stéroïdes ovariens (œstradiol, androgènes), les peptides ovariens (activine, inhibine) ainsi que la mélatonine.

Enfin, différents facteurs environnementaux interviennent dans le contrôle de l'émission de GH. Premièrement, l'ingestion d'aliments diminue les concentrations plasmatiques (Bassett, 1974 ; Perrad et al., 1998) alors qu'une sous-alimentation les augmente (Vance et al., 1992 ; Bauer et al., 1995 ; Barker-Gibb et Clark, 1996). Cet effet inhibiteur de la prise d'aliments est obtenu rapidement, avant même toute variation de la concentration des métabolites ou d'autres hormones dans le sang. Les acides gras volatils produits par la microflore du rumen des ruminants possèdent eux un effet inhibiteur sur la synthèse de GH stimulée par la GHRH, sans intervenir au niveau de l'émission de SS (Matsunaga et al., 1997). Le glucose (Hartman et al., 1993), l'insuline (Driver et Forbes, 1981) et l'IGF-I (Hua et al., 1992 ; Pell et al., 1993 ; Bauer et al., 1995) sériques participent également à l'inhibition de la synthèse de la GH. Pour terminer, on peut signaler un effet du rythme veille-sommeil et des rythmes annuels sur l'émission de la GH (Perrad et al., 1998).

### **3. Effets physiologiques.**

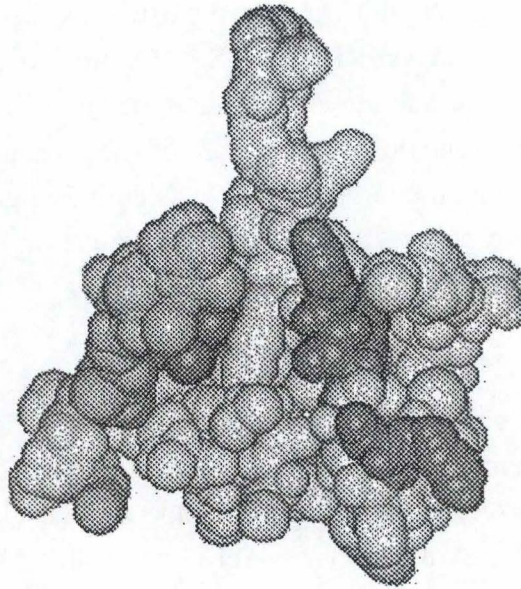
Au niveau de l'organisme, la GH stimule la croissance corporelle, l'activité et le développement de divers organes, influence les métabolismes lipidique et glucidique et exerce un effet anabolisant sur le métabolisme protéique.

Au niveau du système reproducteur en particulier, la GH possède toute une série d'effets qui seront détaillés au chapitre suivant.

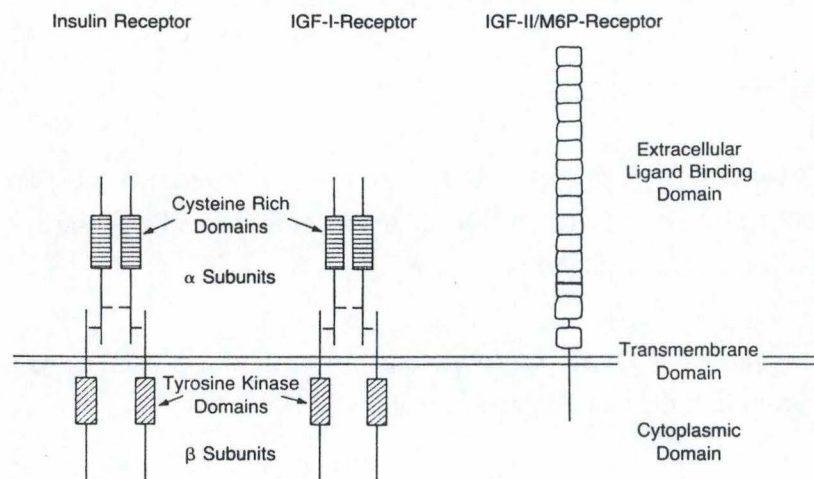
## **II. LES FACTEURS DE CROISSANCE.**

La plupart des facteurs de croissance peuvent stimuler soit la prolifération cellulaire, soit leur différenciation. Certains d'entre eux, comme le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) sont bifonctionnels et sont capables de stimuler ou d'inhiber la croissance, selon le contexte dans lequel ils agissent. Les facteurs de croissance ont été classés dans différentes superfamilles dont les principales sont la famille des somatomédines, la famille des EGF (Epidermal Growth Factors), la famille des FGF (Fibroblast Growth Factors), la famille des PDGF (Platelet-Derived Growth Factors) et la famille des TGF $\beta$  (Williams, 1992).





*Figure 4* : Structure d'une forme particulière de l'IGF-I, le long-(Arg<sup>3</sup>)-IGF-I (Laajoki et Keniry, 1999).



*Figure 5* : Récepteurs des IGF (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

## **1. Les somatomédines ou IGF.**

L'IGF-I ou somatomédine-C (*figure 4*) est un peptide de 70 acides aminés homologue de la proinsuline humaine. L'IGF-II est un peptide de 67 acides aminés homologues de l'IGF-I. L'IGF-I est plus dépendant de la GH et stimule plus la croissance que l'IGF-II, tandis que l'IGF-II a plus d'activité de type insuline que l'IGF-I (Williams, 1992).

### **1.1. Récepteurs aux IGF.**

Il existe deux types principaux de récepteurs aux IGF (IGF-R) : l'IGF-RI et l'IGF-RII (*figure 5*). L'IGF-RI lie préférentiellement l'IGF-I, puis l'IGF-II et dans une moindre mesure l'insuline. Ce récepteur, ainsi que le récepteur à l'insuline, est un hétérotétramère avec deux sous-unités  $\alpha$  (130 kDa) extracytosoliques liantes et deux sous-unités  $\beta$  (90 kDa) intracytosoliques à domaine tyrosine kinase qui permet d'initier la transduction du signal. Ces IGF-RI sont distribués dans tout le corps. Des récepteurs chimériques composés d'une sous-unité  $\alpha\beta$  type IGF-RI liée de façon covalente à une sous-unité  $\alpha\beta$  type récepteur à l'insuline ont également été décrits. L'IGF-II se lie plus souvent avec le récepteur de type II (220 kDa), qui lui ne possède ni sous-unités dissociables, ni activité tyrosine kinase. Ce récepteur a peu d'affinité pour l'IGF-I et ne lie pas du tout l'insuline. Il est pratiquement identique dans sa composition en acides aminés au récepteur au manose-6-phosphate cation-indépendant (Williams, 1992).

### **1.2. Protéines liant les IGF.**

Il y a 6 protéines de 200-300 acides aminés liant les IGF (IGF-BP) numérotées de 1 à 6 (*figure 6*). Les deux premières possèdent un motif RGD (motif de trois acides aminés, Arg-Gly-Asp, reconnu par les intégrines qui sont des récepteurs cellulaires permettant une adhérence à la matrice extracellulaire et aux cellules voisines) tandis que les 4 dernières sont glycosylées.

L'IGF-BP1 lie l'IGF-I et l'IGF-II ; elle est exprimée principalement au niveau de la décidue, de l'endomètre et du foie fœtal. L'IGF-BP2 (exprimée dans le foie fœtal, et chez l'adulte dans les reins, l'estomac, les poumons et le cerveau) possède une affinité trois fois plus forte pour l'IGF-II que pour l'IGF-I. L'IGF-BP3, sécrétée en plus grande concentration dans le foie adulte et dans le sérum, et dans une moindre mesure dans les reins, l'estomac, le placenta, l'utérus et les ovaires, possède une affinité très forte pour les IGF-I et -II. L'IGF-BP4, synthétisée surtout par le foie, lie les deux IGF avec la même affinité. L'IGF-BP5 (dans l'ovaire, le placenta, les reins, le foie et les fibroblastes) a une affinité pour les IGF beaucoup plus grande que toutes les autres IGF-BP et valant 50 fois celle de l'IGF-RI. Enfin, L'IGF-BP6 (dans le sérum, les ovaires et le placenta) a 10 à 100 fois plus d'affinité pour l'IGF-II que pour l'IGF-I.



IGFBP	Human chromosome	rnRNA size (kb)	Molecular mass (kDa)	Special features
IGFBP-1	7p12-p13	1.6	26	RGD
IGFBP-2	2q33-q34	1.4	30	RGD
IGFBP-3	7	2.5	28	N-glycosylated
IGFBP-4	17	2.6	25	N-glycosylated
IGFBP-5	5	6.0	28	
IGFBP-6	12	1.3	21	O-glycosylated

**Figure 6** : Différents IGF-BP, localisation chromosomique du gène, taille du mRNA, masse moléculaire de la protéine et motifs spéciaux d'acides aminés (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

Comme pour la GH-BP, les IGF-BP ont différentes actions au niveau de la modulation de l'action des IGF. L'intérêt de ces IGF-BP au niveau de l'ovaire et du développement folliculaire sera expliqué au chapitre suivant. La synthèse de l'IGF-BP3 est stimulée par la GH par l'intermédiaire de l'IGF-I ainsi que par le TGF $\beta$ . La concentration en IGF-BP2 diminue si celle en GH augmente, par contre l'IGF-I stimule sa synthèse. L'expression de l'IGF-BP4 est inhibée ou stimulée par l'IGF-I/II suivant les tissus. Enfin, la concentration en IGF-BP5 augmente in vitro en présence d'IGF-I/II car ceux-ci forment un complexe avec elle et empêchent alors sa dégradation par une protéase (Cohick et Clemmons, 1993).

### 1.3. Régulation des IGF hépatiques.

Dans le sang, les teneurs totales en IGF-I et IGF-II (respectivement 200 et 600  $\mu\text{g/l}$  chez un adulte normal) dépendent des concentrations en IGF-BP qui permettent le maintien de taux élevés et stables (Williams, 1992).

On sait déjà que la GH stimule la production d'IGF-I. Par contre, une sous-alimentation qui a tendance à augmenter la concentration circulante de GH va plutôt diminuer la concentration en IGF-I ainsi que la liaison de la GH à ses récepteurs hépatiques.

Les taux d'IGF-I/II varient aussi suivant le stade de développement fœtal ce qui indique probablement un rôle important des IGF dans ce développement (Cohick et Clemmons, 1993). Ces taux diminuent à la naissance et durant les premières années de vie de l'enfant pour ensuite augmenter jusqu'à la puberté et pendant la puberté (taux 2,5 à 3 fois plus hauts que chez l'adulte). Ces augmentations semblent d'ailleurs être liées à la puberté elle-même car les pics de concentration d'IGF-I sont corrélés aux âges respectifs de la puberté chez les filles et chez les garçons (11-13 et 13-15 ans). Cette augmentation de concentration d'IGF-I est probablement provoquée par celle de GH. L'IGF-II augmente légèrement durant l'enfance mais il n'y a pas de variation particulière lors de la (Williams, 1992).

La régulation particulière des IGF au niveau du système reproducteur sera abordée dans le chapitre suivant.

### 1.4. Actions générales des IGF.

Les IGF sont présents dans beaucoup de tissus, avec des concentrations toutefois moindres que dans le sang. Les somatomédines agissent en premier lieu comme des mitogènes dans quelques tissus, stimulent la différenciation cellulaire sans prolifération dans d'autres, et stimulent la production de substances cellulaires caractéristiques du tissu dans tous les tissus sensibles. Les IGF-I et -II augmentent la synthèse d'ADN et la prolifération



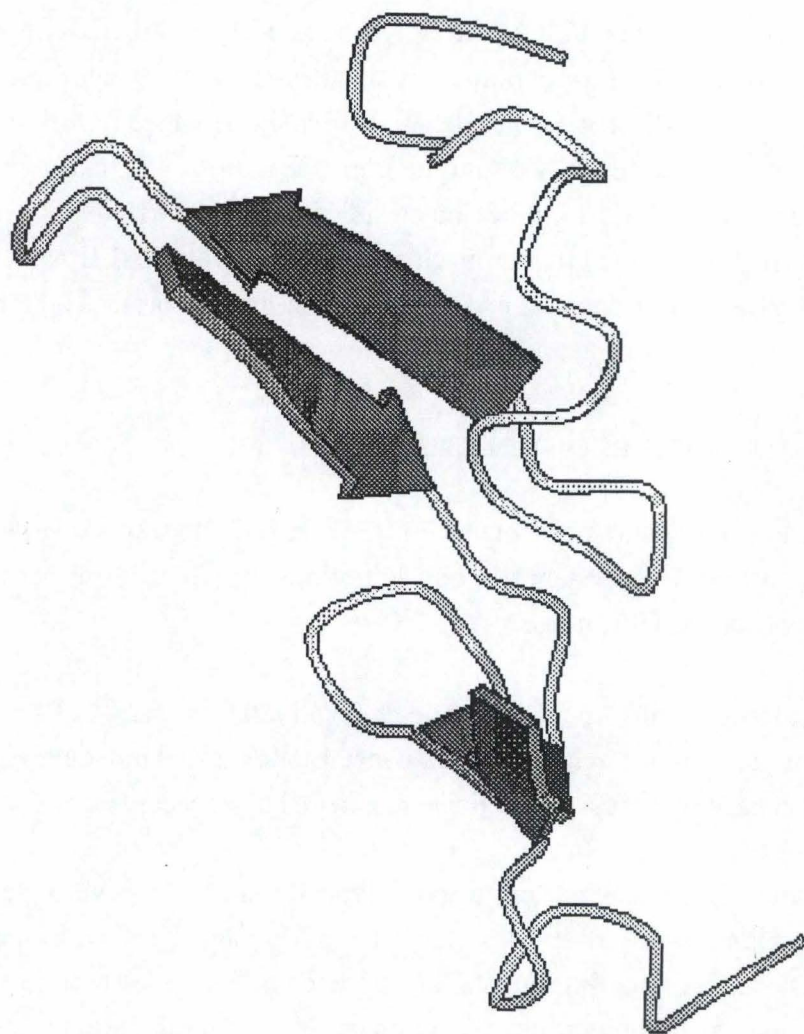


Figure 7 : Structure de l'EGF (Hommel et al., 1992).

cellulaire dans des cellules de diverses origines embryologiques et dans des organismes allant des invertébrés à l'homme.

En vrac, la GH et donc l'IGF-I stimulent l'hématopoïèse, et les IGF stimulent l'action des CSF (Colony Stimulating Factor, qui interviennent dans la formation des différents éléments figurés du sang). L'IGF-I agit en synergie avec la thyrotropine pour stimuler la division des cellules folliculaires thyroïdiennes. Dans les muscles, les IGF augmentent la prolifération et la différenciation des myoblastes. L'IGF-I permet la médiation de la stimulation de la croissance par la GH dans le squelette,... (Williams, 1992). Les effets au niveau du système reproducteur seront analysés au chapitre suivant.

## **2. Les EGF.**

### **2.1. Les membres de la famille EGF.**

Le premier EGF à avoir été identifié, l'EGF murin, a été découvert en 1962 ; il est composé de 53 acides aminés. Il a été extrait de glandes salivaires de souris et est un hétérotétramère composé de deux molécules d'EGF et de deux protéines liantes de 29 kDa. Son homologue humain (*figure 7*) possède 37 acides aminés identiques à l'EGF murin et est aussi appelé urogastrone.

Le TGF $\alpha$  est un autre membre de la famille des EGF. C'est un peptide de type EGF sécrété par beaucoup de tumeurs et capable d'interagir avec le récepteur aux EGF de cellules normales. Il fait 50 acides aminés et possède 35 % d'homologie de séquence avec l'EGF. Le TGF $\alpha$  est aussi produit par des cellules normales telles que celles de la décidue, du système nerveux central ou encore de la peau.

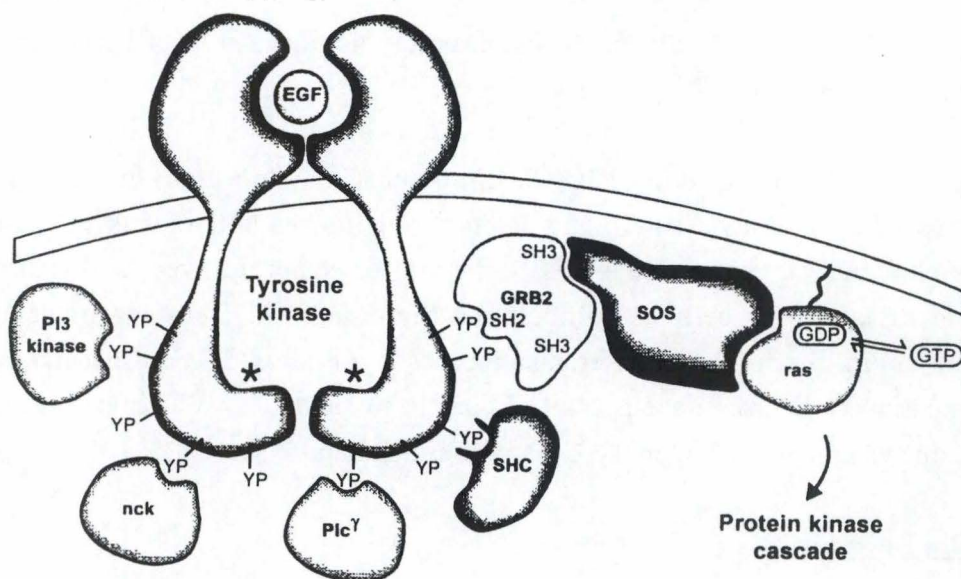
Enfin, il y a l'amphiréguline qui est une glycoprotéine de 78 acides aminés identique à l'EGF pour 38 % de sa séquence (Williams, 1992), et l'HB-EGF (Heparin-Binding EGF) dont le précurseur est un composant du récepteur à la toxine diphtérique (Massagué et Pandiella, 1993).

### **2.2. Structure et fonctions.**

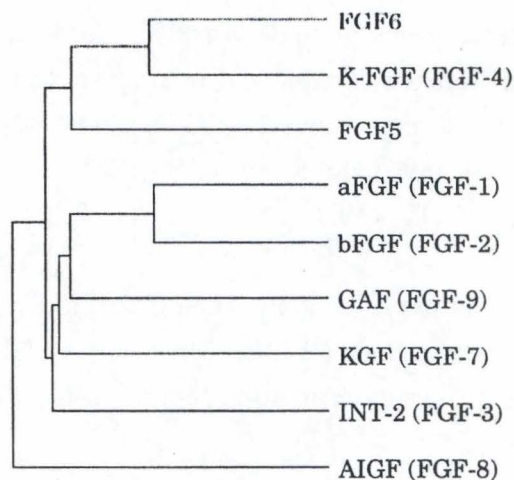
Au point de vue de la régulation chez la souris, la concentration en EGF dans les glandes salivaires dépend des androgènes : les glandes salivaires mâles contiennent 15 fois plus d'EGF que les glandes salivaires femelles. Dans la peau, la concentration en EGF est aussi régulée par les hormones thyroïdiennes, surtout lors des 5 premiers jours de vie.

Le récepteur à l'EGF (EGF-R) possède un poids moléculaire allant de 160 à 190 kDa dans différents tissus suivant sa glycosylation. La liaison de l'EGF à son récepteur est suivie





**Figure 8** : Modèle de l'activation de ras à partir de l'EGF-R  
(in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).



**Figure 9** : Relation entre les FGF du point de vue de l'évolution  
(in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

de l'internalisation du complexe EGF-récepteur et d'une régulation du nombre d'EGF-R à la surface de la cellule. L'EGF-R liant l'EGF va dimériser, se transphosphoryler via des domaines intracytosoliques à activité tyrosine kinase et ainsi démarrer une cascade de transduction du signal (*figure 8*) passant notamment par la protéine Ras et les MAP kinases (pour Mitogen Activated Protein Kinase). Cette cascade aboutit finalement à différents facteurs de transcription qui vont ainsi modifier l'expression de certains gènes (in : Biologie Moléculaire de la Cellule, 1997). Il existe un autre EGF-R pouvant lier l'amphiréguline.

Les actions de l'EGF se basent surtout sur sa capacité à stimuler la prolifération des couches de cellules basales de l'ectoderme. L'EGF possède des effets sur d'autres processus prolifératifs et développementaux, notamment sur le développement fœtal pour l'EGF et le TGF $\alpha$  (Williams, 1992).

### **3. Les FGF ou GF liant l'héparine.**

#### **3.1. Découverte et formes existantes.**

Les FGF furent à l'origine découverts dans des extraits de cerveau et de glande pituitaire. Deux formes ont tout d'abord été isolées : une forme acide (pI 4,5) appelée aFGF (acid FGF) et une forme basique (pI 9,6) appelée bFGF (basic FGF). La forme basique se trouve dans une série de tissus dérivés du mésoderme et du neurectoderme, tandis que la forme acide est plus confinée aux tissus nerveux et à la rétine. Maintenant, on connaît 9 membres dans la famille des FGF (*figure 9*), possédant entre eux de 30 à 70 % d'identité au niveau de la séquence en acides aminés. On y retrouve notamment le KGF (Keratinocyte Growth Factor ou FGF-7 ; Burgess et Maciag, 1989 ; Basilico et Moscatelli, 1992) et le AIGF (Androgen-Induced Growth Factor ou FGF-8 ; Tanaka et al., 1992).

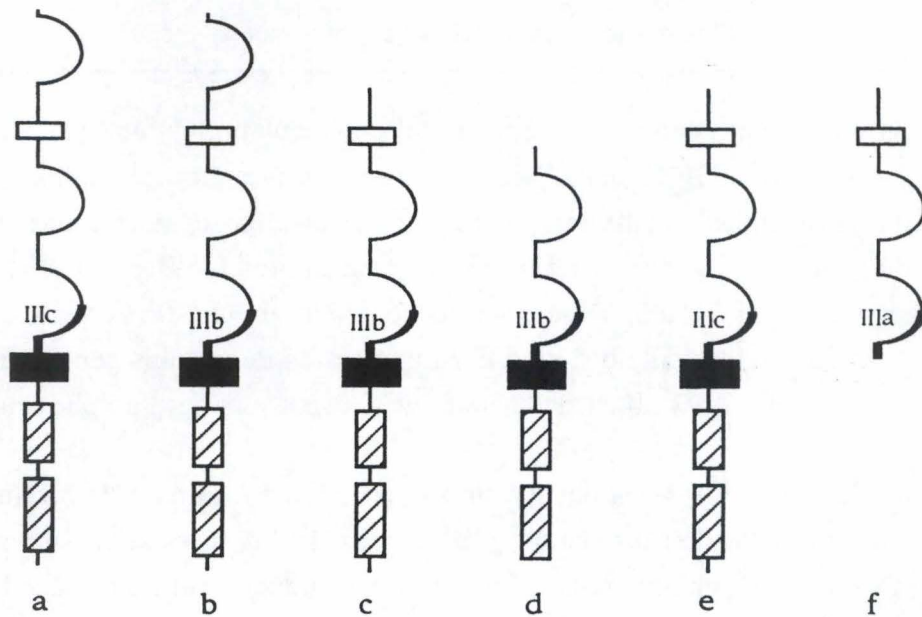
Les FGF ont une propriété unique de liaison à l'héparine d'où le classement dans la famille des FGF d'autres GF liant l'héparine portant le nom d'HBGF (Heparin-Binding Growth Factor). Des HBGF ont été isolés d'une grande variété de cultures cellulaires, d'extraits d'organes et de tumeurs (Williams, 1992).

#### **3.2. Récepteurs.**

Il existe 5 gènes codant pour 5 récepteurs aux FGF (FGF-R) numérotés de 1 à 5. Chaque FGF-R possède lui-même plusieurs variants. FGFR-1 (*figure 10*), -2, -3 et -4 sont exprimés dans différents tissus embryonnaires. Ils sont aussi exprimés, avec le FGFR-5, dans toute une série de tissus adultes.

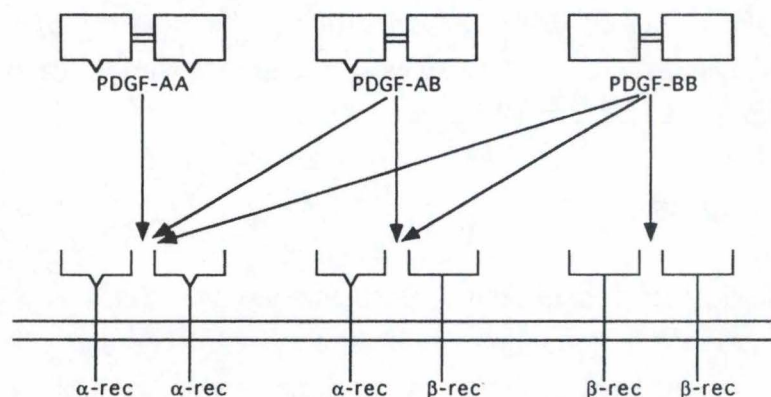
La liaison du FGF à son récepteur provoque soit la prolifération, la différenciation, l'inhibition de la différenciation ou encore le maintien d'un phénotype suivant le type





**Figure 10** : Différentes formes de structure protéique des FGFR.

- (a) forme la plus longue des FGFR-1, 2, 3, 4 et 5 avec trois domaines Ig-like (forme IIIc pour le troisième),
  - (b) K-sam', variant du FGFR-2 (forme IIIb pour le troisième domaine Ig-like),
  - (c) K-sam, autre forme du FGFR-2 tronquée coté C-terminal,
  - (d) KGFR, autre forme du FGFR-2 ayant perdu le premier domaine Ig-like et la séquence acide,
  - (e) Bek', autre variant du FGFR-2 à deux domaines Ig-like (premier domaine perdu, forme IIIc pour le troisième),
  - (f) variant du FGFR-I sécrété avec le domaine acide et les domaines Ig-like 2 et 3 (forme IIIa pour le troisième),
- (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).



**Figure 11** : Interaction des isoformes du PDGF aux complexes homo- ou hétérodimériques des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  du PDGF  
(in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

cellulaire (Burgess et Maciag, 1989). L'héparane sulfate, un protéoglycan qui lie les FGF avec une faible affinité semble jouer un rôle important au niveau de la liaison des FGF à leurs récepteurs à haute affinité (Kiefer et al., 1990 ; Yayon et al., 1991). La liaison ligand-récepteur provoque la dimérisation du récepteur (avec FGFR-1, -2 ou -3, formant des homo- ou des hétérodimères) qui résulte en une activité tyrosine kinase permettant une transphosphorylation du récepteur dimérisé (Bellot et al., 1991 ; Ueno et al., 1992).

### 3.3. Effets physiologiques.

Les FGF sont des mitogènes pour une large gamme de types cellulaires provenant du mésenchyme ou du neur ectoderme. D'autre part, le aFGF et le bFGF induisent l'angiogenèse in vivo et ont des effets chimotactiques et mitogéniques sur les cellules endothéliales in vitro (Basilico et Moscatelli, 1992).

Les FGF sont aussi impliqués dans le processus de différenciation de beaucoup de cellules. Ils stimulent notamment la croissance de neurites de cellules ganglionnaires rétiniennes. La présence des aFGF, bFGF et FGF-5 en abondance dans différents tissus nerveux adultes (cerveau, motoneurones,...) suggère que les FGF jouent un rôle important dans la physiologie neurale chez l'adulte (Tanaka et al., 1992 ; Basilico et Moscatelli, 1992 ; Elde et al., 1991).

Ils sont aussi fort présents dans différents tissus embryonnaires et fœtaux, indiquant ainsi une fonction probable dans le développement (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994). Ils peuvent enfin retarder la sénescence de cellules en culture parfois de plusieurs dizaines de générations, comme pour les cellules de granulosa (Williams, 1992).

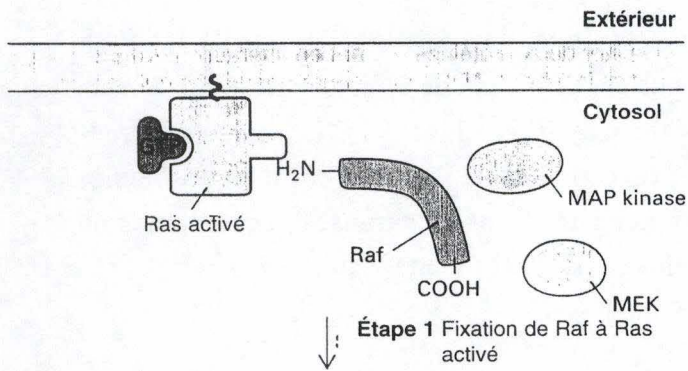
## 4. Les PDGF.

### 4.1. Découverte et formes existantes.

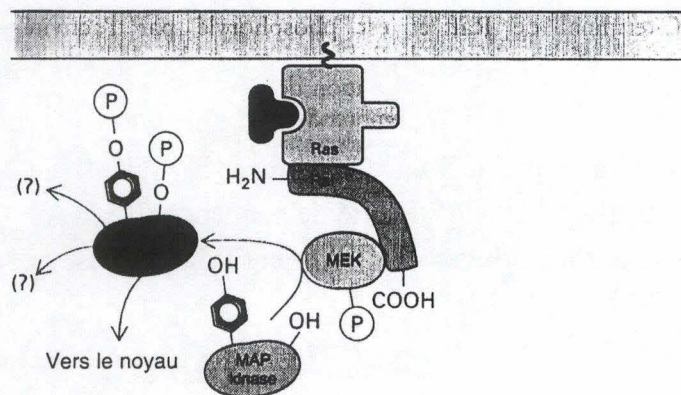
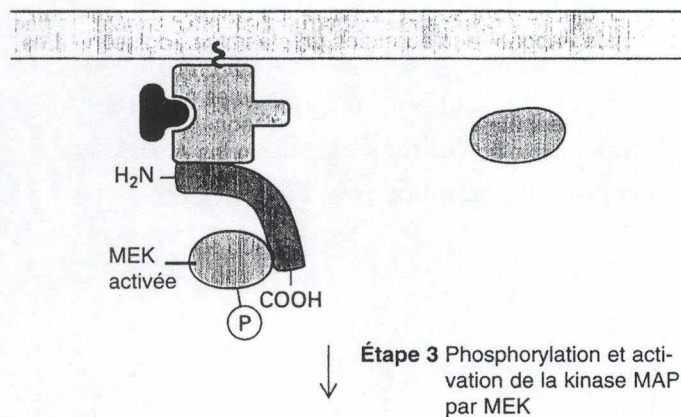
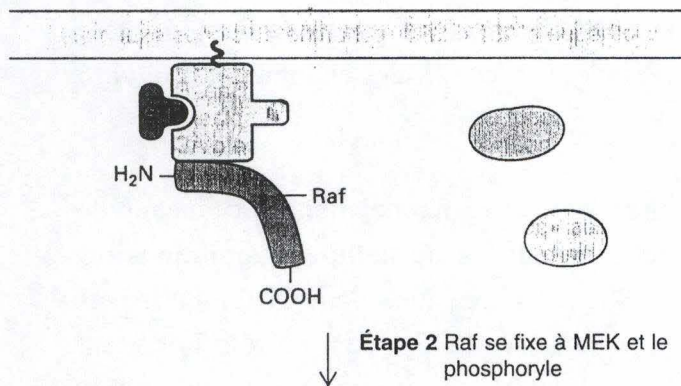
Le PDGF a été découvert comme étant une substance libérée par les plaquettes lors d'une lésion, et agissant comme une hormone de blessure pour stimuler la prolifération des fibroblastes et des cellules musculaires lisses.

Le PDGF est un peptide homo- ou hétérodimérique de 30kDa hautement basique. Il existe deux chaînes constitutives appelées A et B ayant 60 % d'identité de séquence. Il y a d'autre part deux variantes de la chaîne A. On peut donc trouver naturellement trois formes possibles de PDGF (*figure 11*) : AA, AB et BB (Williams, 1992).





CELLULE STIMULÉE



**Figure 12 :** Cascade de kinases transmettant les signaux émis par la protéine ras activée (à partir d'un stimulus d'un facteur de croissance (EGF, PDGF),...). La ras activée lie un GTP, ce qui va permettre l'activation de raf qui va phosphoryler MEK qui elle-même va activer la MAP kinase par phosphorylation (in : Biologie moléculaire de la cellule, 1997).



#### 4.2. Récepteurs.

Deux types de récepteurs à haute affinité pour les PDGF d'environ 170 kDa sont présents dans beaucoup de types cellulaires, surtout d'origine mésenchymateuse. Ces récepteurs sont nommés  $\alpha$  et  $\beta$ . Lorsqu'un des monomères se lie à un récepteur  $\alpha$  ou  $\beta$  (*figure 11*), il pourra de par sa forme dimérique induire la dimérisation du récepteur (le récepteur  $\alpha\alpha$  liant plutôt AA, AB et BB, le récepteur  $\alpha\beta$  liant AB et BB et le récepteur  $\beta\beta$  liant seulement BB). Cette dimérisation va permettre une transphosphorylation des domaines intracytosoliques des récepteurs qui possèdent une activité tyrosine kinase. La voie de transduction du signal (*figure 12*) passe comme pour le récepteur à l'EGF par l'activation de Ras et de la voie des MAP kinases pour aboutir à différents facteurs de transcription qui vont être activés (in : Biologie Moléculaire de la Cellule, 1997).

#### 4.3. Rôles dans la croissance cellulaire.

Le PDGF est dans le sang concentré dans les granules  $\alpha$  des plaquettes où il est séquestré jusqu'à ce qu'une blessure ou un autre stimulus conduise à la dégranulation plaquettaire. Le PDGF rend ainsi les cellules compétentes à faire de la synthèse d'ADN, mais nécessite l'intervention d'IGF et d'autres substances qui vont permettre à ces cellules compétentes de passer la phase G1 du cycle pour entrer en phase de synthèse d'ADN.

Lors de blessures, le PDGF est un puissant agent chimotactique qui recrute des macrophages pour ensuite stimuler la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales (Williams, 1992).

L'expression spécifique du PDGF et de ses récepteurs dans différents tissus lors du développement embryonnaire et fœtal suggère que le PDGF régule la croissance et la différenciation des cellules dans le fœtus et dans le placenta (Palmieri et al., 1993).

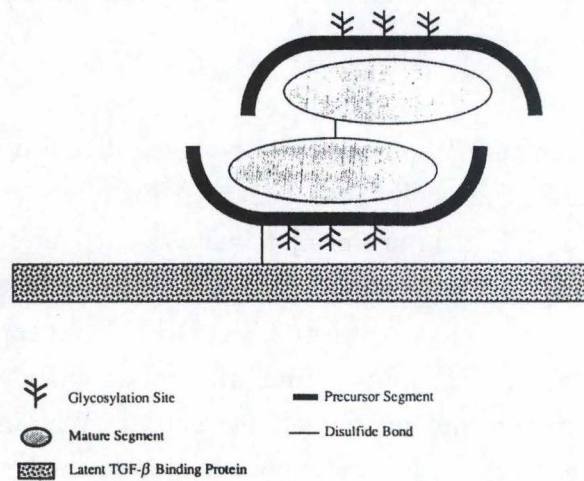
### 5. Les TGF $\beta$ .

La superfamille des TGF $\beta$  reprend trois membres homologues (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3) et un groupe de polypeptides apparentés reprenant l'hormone antimüllérienne (AMH), l'inhibine, l'activine,... Récemment, un nouveau membre de la famille TGF $\beta$  a été isolé et cloné chez la souris (Dong et al., 1996) puis chez les ovins et les bovins (Bodensteiner et al., 1999). Il est appelé GDF-9 pour facteur de croissance et de différenciation numéro 9.

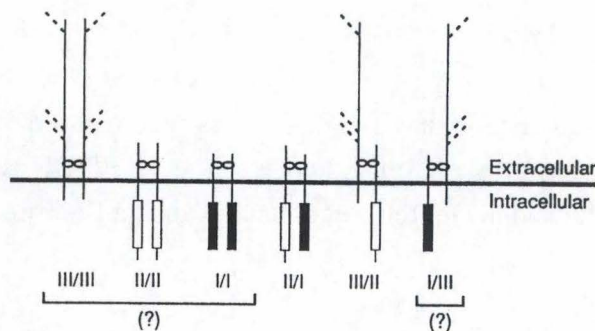
#### 5.1. Les différents TGF $\beta$ .

Les trois peptides matures ont environ 75 % d'homologie et ils forment des dimères de 25 kDa composés de deux monomères identiques. L'inhibine, l'activine et l'AMH ont de





**Figure 13 :** Structure du complexe inactif de TGFβ : un homodimère de la portion mature C-terminale de la molécule est entouré par des segments précurseurs dont l'un est associé à une forme latente de la TGFβ-BP (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).



**Figure 14 :** Représentation schématique des trois récepteurs des TGFβ (différentes associations en homo- ou en hétérodimères peuvent être observées) (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

20 à 40 % d'homologie avec les TGF $\beta$ . En culture cellulaire, les TGF $\beta$  sont sécrétés sous une forme inactive (*figure 13*) et peuvent alors être activés soit par une association acide-chaueur ou encore par un traitement avec une protéase telle que la plasmine ou la cathepsine. Les inhibiteurs de la plasmine vont donc inhiber une partie des actions paracrines médiées par les TGF $\beta$  (Williams, 1992).

### 5.2. Récepteurs.

Trois protéines glycosylées situées en membrane cellulaire et liant les TGF $\beta$  ont été identifiées (*figure 14*). Leurs masses respectives sont de 55, 85 et 280 kDa. La protéine de type 3, plus lourde, est en partie constituée d'héparane sulfate et de chondroïtine sulfate. Les récepteurs de type 1 (TGF $\beta$ -R1) et 2 sont tous les deux des sérines/thréonines kinases transmembranaires, et le signal ne passe que si le TGF $\beta$  se fixe à un hétérodimère composé de ces deux protomères. Le mécanisme de transduction du signal n'est pas encore élucidé. Le récepteur de type 3 ajusterait l'accès du TGF $\beta$  à l'hétérodimère TGF $\beta$ -RI/II transducteur du signal. Il joue donc un rôle modulateur important (in : Biologie Moléculaire de la Cellule, 1997).

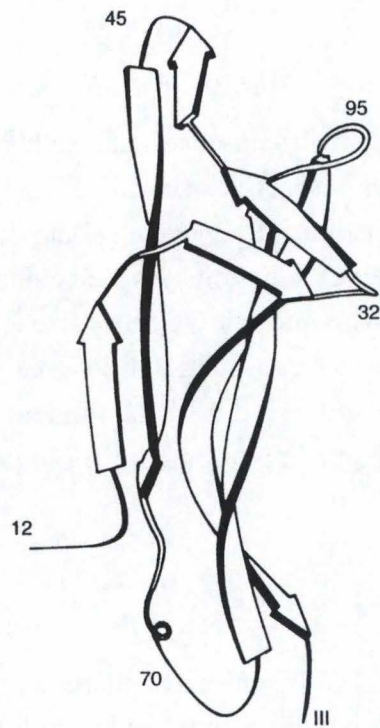
### 5.3. Rôles physiologiques.

Les membres de la famille TGF $\beta$  sont particulièrement intéressants à cause de leur bifonctionnalité. Le TGF $\beta$  est un inhibiteur potentiel de la croissance, et la production par des cultures de cellules en monocouches de TGF $\beta$ 2 peut être responsable de l'inhibition de la croissance dépendant de la densité. Le TGF $\beta$  peut ainsi inhiber la croissance d'à peu près tous les types cellulaires, mais son effet le plus important reste celui qu'il exerce sur les cellules épithéliales. Dans certaines circonstances, le TGF $\beta$  stimule la prolifération de cellules dérivées du mésenchyme telles que les fibroblastes et les ostéoblastes.

En réalité, le TGF $\beta$  illustre le fait que la réponse d'une cellule à un signal hormonal puisse être déterminée plus par les conditions environnementales dans lesquelles la cellule se trouve plutôt que par le signal lui-même. En effet, la croissance de fibroblastes en culture est stimulée par le TGF $\beta$  en présence de PDGF mais est inhibée en présence d'EGF (Williams, 1992).

Une autre série des actions du TGF $\beta$  comprend celles qui affectent la matrice extracellulaire (MEC). En effet, ce facteur augmente la sécrétion de plusieurs protéines de la MEC et la production d'intégrines et autres récepteurs cellulaires qui lient ces protéines. Enfin, il diminue la synthèse de protéases dégradant les protéines de la MEC, telles que les métalloprotéases, et augmente la production d'inhibiteurs de protéases notamment les inhibiteurs tissulaires (TIMP). Ainsi, l'effet principal du TGF $\beta$  sur la MEC est d'en





*Figure 15* : Représentation schématique du monomère du NGF  
 (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

augmenter la production et de stimuler l'interaction des cellules avec leur substrat (Derynck, 1994 ; Massagué, 1990 ; Roberts et Sporn, 1990).

Enfin, le TGF $\beta$  a un rôle important dans la différenciation du système immunitaire, et agit en tant qu'immunosuppresseur (Derynck, 1994 ; Roberts et Sporn, 1990 ; Kehrl, 1991). Il est aussi essentiel pour la réparation tissulaire après une blessure (Amento et Beck, 1991). La distribution étendue du TGF $\beta$  et de ses récepteurs durant le développement suggère qu'il soit un des acteurs cytokiniques intervenant dans l'embryogenèse (Pelton et al., 1991). Pour terminer, le TGF $\beta$ 1 est produit dans beaucoup de tumeurs, et stimule la croissance tumorale in vivo (Arteaga et al., 1993).

#### 5.4. Autres membres homologues de la famille des TGF $\beta$ .

L'AMH a été premièrement décrite par Jost comme un facteur testiculaire responsable de la régression prénatale des canaux müllériens chez les embryons mâles. L'AMH a ensuite été identifiée comme étant homologue au TGF $\beta$ . Elle est présente dans l'ovaire fœtal ainsi que postnatalement dans les follicules de De Graaf matures. Chez les filles, l'AMH agit comme un inhibiteur de la maturation ovocytaire.

L'inhibine est présente à la fois dans les testicules et dans les ovaires. C'est un hétérodimère avec deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  liés de façon covalente par des ponts disulfures. La sous-unité  $\beta$  a des homologies de séquence avec le TGF $\beta$  et l'AMH. L'activine est composée de deux sous-unités  $\beta$  liées de façon covalente. Inhibine et activine ont des effets opposés au niveau de la glande pituitaire et des gonades (Williams, 1992).

### 6. Les facteurs de croissance spécifiques.

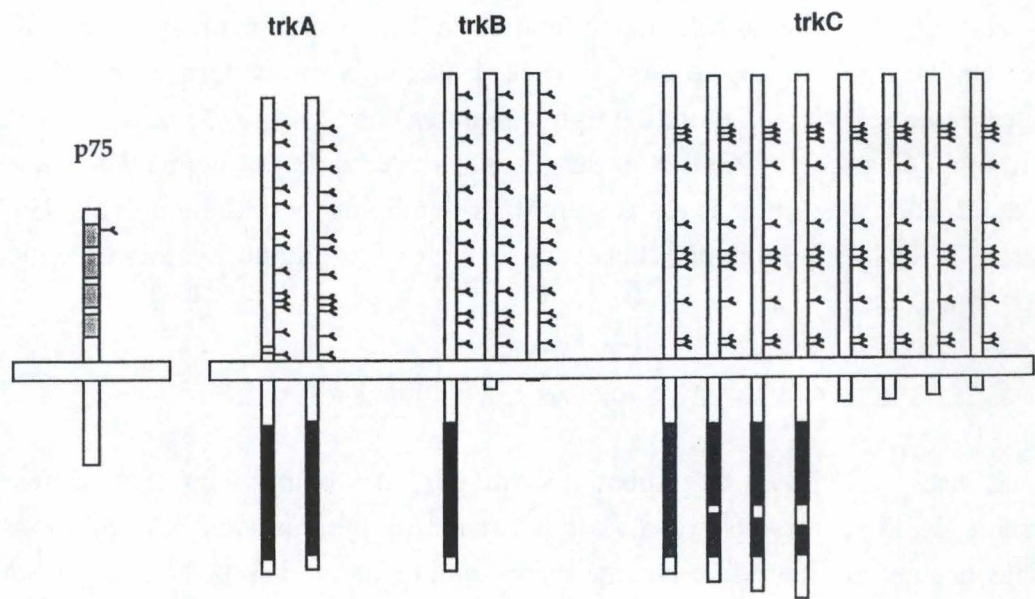
En contraste avec les superfamilles de facteurs de croissance qui stimulent la prolifération de toute une série de cellules, d'autres facteurs de croissance sont plus ou moins spécifiques pour des types cellulaires.

#### 6.1. Le facteur de croissance des nerfs.

Les membres de la famille des NGF (Nerve Growth Factor), aussi appelés neurotrophines sont de petites protéines basiques qui permettent la survie neuronale. On y retrouve le NGF (*figure 15*), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF pour Brain-Derived Neurotrophic Factor), la neurotrophine-3 (NT-3) et les neurotrophines 4/5 (NT-4/5) qui se lient toutes les deux au même récepteur (Ip et al., 1993).

Le NGF a été découvert en 1951 par Montalcini et Hamburger chez l'embryon de poulet. Comme l'EGF, on retrouve du NGF en grande quantité dans les glandes





*Figure 16* : Représentation des différents récepteurs des neurotrophines avec les diverses formes existantes (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

submaxillaires de souris. Le NGF comprend trois types de sous-unités et a un poids moléculaire de l'ordre de 140 kDa.

Il existe deux types de NGF-R (Récepteur aux NGF) aux niveau des cellules nerveuses (*figure 16*). Le récepteur au neurotrophines p75 possède un motif de cystéines répétées du côté extracellulaire. Les récepteurs trk sont activés par les neurotrophines par un mécanisme impliquant l'homodimérisation. Chaque récepteur trk est spécifique : trkA lie le NGF, trkB lie plutôt le BDNF et la NT-4, et trkC lie préférentiellement la NT-3 (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

Les effets biologiques du NGF sont de promouvoir la survie, la différenciation et la croissance axonale des ganglions sympathiques. Vu que les neurones ne peuvent plus se diviser après s'être différenciés, le NGF n'a pas de rôle de mitogène pour le système nerveux mature. Par contre, c'est un faible mitogène pour les tissus lymphoïdes et pour le tissu nerveux de jeunes embryons. Le NGF accélère aussi la différenciation biochimique et morphologique des cellules souches au niveau des neurones sensoriels et sympathiques. Enfin, le NGF est un chémoattractant pour les leucocytes neutrophiles (Williams, 1992).

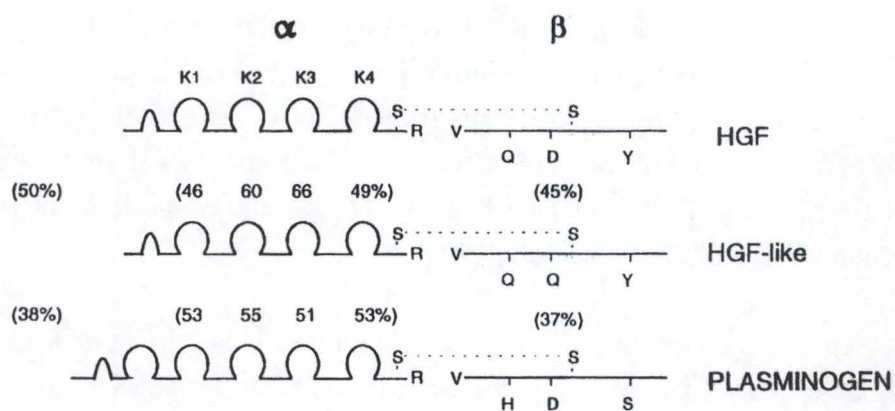
## 6.2. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a été identifié la première fois en 1989. Les études réalisées depuis ont montré l'importance du VEGF dans les processus angiogéniques normaux et pathologiques. Il existe toute une famille de VEGF et de récepteurs (VEGF-R) à activité tyrosine kinase produits sélectivement par les cellules endothéliales vasculaires.

Le VEGF est un facteur angiogénique puissant pour la cornée de lapin et la membrane chorio-allantoïdienne de poulet. L'ajout de VEGF à des cellules endothéliales vasculaires induit une réponse pléiotrope (prolifération, production de métalloprotéases et de sérines protéases) qui contribue à la formation de néovaisseaux. Le VEGF est aussi connu comme étant un facteur de perméabilité (VPF pour Vascular Permeability Factor).

Le facteur VEGF est une glycoprotéine homodimérique de 34-36 kDa liant l'héparine dont la séquence présente de faibles analogies avec les chaînes A et B du PDGF. Quatre formes du peptide sont produites grâce à un épissage alternatif du même gène qui comporte huit exons. Ces 4 formes comprennent respectivement 121, 165, 189 et 206 acides aminés, cette dernière forme ne se retrouvant que dans les tissus embryonnaires. Chez l'adulte, VEGF est produit dans de nombreux tissus normaux, en particulier les reins, le cœur et les poumons.





**Figure 17 :** HGF et molécules apparentées : chaîne  $\alpha$  avec quatre domaines associée à une chaîne  $\beta$  ayant une homologie importante avec des protéases à sérines (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

Les différentes formes de VEGF reconnaissent deux types de récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille Fms. La protéine Flt-1 est un récepteur de forte affinité et la protéine KDR (ou son homologue murin Flt-1) est un récepteur de basse affinité qui serait responsable des effets mitogènes du peptide. Il existe également une forme soluble du récepteur Flt-1 (sFlt-1) ne comprenant que la partie extracellulaire du récepteur Flt-1.

L'ADNc du facteur PlGF (Placenta Growth Factor), le premier analogue de VEGF, a été cloné à partir de placenta humain en 1991. Deux formes de PlGF peuvent être synthétisées par épissage alternatif. Le PlGF présente 53 % d'identité avec le VEGF, et se lie, sous une forme homodimérique, aux récepteurs Flt-1 qu'il partage avec le VEGF. Il peut former des hétérodimères avec VEGF165, ce qui favoriserait sa liaison aux récepteurs KDR.

Il y a encore le VEGF-B possédant 167 acides aminés et 30 à 43 % d'homologie avec VEGF et PlGF. Il peut aussi former des hétérodimères avec VEGF165. VEGF-C reconnaît deux récepteurs à activité tyrosine kinase : Flk-1/KDR et Llt-4. La production de ce dernier est limitée à l'endothélium lymphatique et veineux (Frelin et al., 1997).

L'exposition de différentes cultures cellulaires à une faible pression partielle d'oxygène stimule la production de VEGF. EGF, TGF- $\beta$  et KGF (Keratinocyte Growth Factor) induisent la production de VEGF dans les cultures de kératinocytes (Ferrara, 1996).

Enfin, d'autres facteurs angiogènes ont été identifiés : le FGF-1, le FGF-2, le TNF- $\alpha$ , l'angiogénine, les TGF- $\alpha/\beta$ , le PD-ECGF (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor), la pléiotrophine et l'interleukine-8 (IL-8) (Klagsbrun et D'Amore, 1996).

### 6.3. Le facteur de croissance des hépatocytes.

Le « scatter factor », le mitogène pulmonaire humain dérivé des fibroblastes, l'hépatopoïétine A, l'hépatotrophine, le facteur cytotoxique des tumeurs : tous ces noms désignent une même molécule que l'on appelle le facteur de croissance des hépatocytes ou HGF.

Le HGF est un hétérodimère composé d'une grosse sous-unité  $\alpha$  de 60 kDa et d'une petite sous-unité  $\beta$  de 32 ou de 36 kDa reliées par un pont disulfure. Ces sous-unités proviennent du clivage protéolytique d'un seul précurseur de 92 kDa (Miyazawa et al., 1991 ; Nakamura et al., 1989 ; Weidner et al., 1991 ; Rubin et al., 1991). Le HGF possède une structure homologue à celle du plasminogène avec lequel il a 38 % d'homologie de séquence primaire (*figure 17*).

Le HGF est produit par les cellules non-parenchymateuses du foie, des reins et des poumons. Les cellules parenchymateuses de ces tissus expriment le récepteur au HGF (HGF-



R) à de hauts niveaux (Gherardi et Stoker, 1991). Le clivage protéolytique du précurseur, qui permet l'activation du HGF (Naka et al., 1992 ; Naldini et al., 1992) peut être effectué par l'urokinase qui agit comme une convertase pro-HGF (Naldini et al., 1992).

Le HGF-R est un hétérodimère de 190 kDa formé de deux sous unités  $\alpha\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est extracellulaire tandis que la sous-unité  $\beta$  possède une portion extracellulaire impliquée dans la liaison du ligand ainsi qu'une portion intracellulaire à activité tyrosine kinase possédant des sites de phosphorylation régulant son activité. Les deux sous-unités dérivent de la glycosylation et du clivage protéolytique d'un précurseur commun.

Le HGF est mitogène pour les hépatocytes en culture primaire (Nakamura et al., 1984) et est considéré comme étant le médiateur majeur de la régénération du foie *in vivo*. Il est un facteur multi-fonctionnel pour plusieurs types de cellules épithéliales. Il stimule la croissance de l'épithélium tubulaire de rein et des kératinocytes, des cellules endothéliales et des mélanocytes (Rubin et al., 1991 ; Bussolino et al., 1992). Il provoque la dissociation des couches de cellules épithéliales (effet « scatter ») et augmente leur motilité et leur invasivité (Stoker et al., 1987 ; Weidner et al., 1990). Il est enfin un facteur angiogénique potentiel qui stimule la motilité et la croissance endothéliale (Bussolino et al., 1992).

#### 6.4. L'érythropoïétine.

L'EPO (Erythropoïétine) est une glycoprotéine de 30,4 kDa produite par le rein et stimulant la formation des précurseurs des érythrocytes au niveau de la moëlle osseuse rouge. Le stimulus majeur provoquant la production d'EPO est une anoxie provenant d'une anémie, de l'altitude ou encore d'une hypoventilation. Même si l'oxygénation des artères rénales est le facteur majeur dans la régulation « feed-back », la production d'EPO est aussi sous contrôle des androgènes et de la GH.

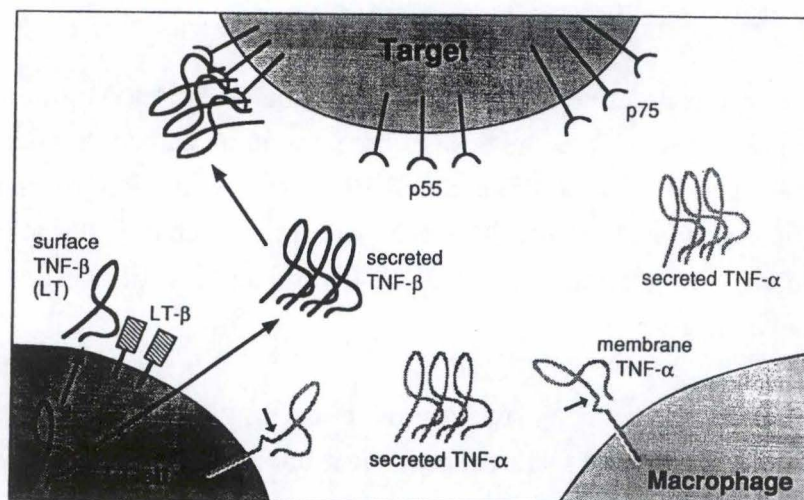
Le rôle de la GH est d'ajuster la production de globules rouges en fonction de la masse corporelle, et un excès de GH peut provoquer une polycythémie. Cet effet de la GH est médié par l'IGF-I qui stimule à la fois la production et l'action au niveau cellulaire de l'EPO. Dans certaines conditions, comme chez un patient anéphrique, l'IGF-I peut se substituer à l'EPO et devenir le facteur érythropoïétique circulant majeur.

L'effet des androgènes peut être observé au niveau de l'augmentation des taux de globules rouges chez le mâle après la puberté, et chez les femelles possédant de hautes concentrations plasmatiques de testostérone (Williams, 1992).

Les récepteurs à l'EPO (EPO-R) sont exprimés dans plusieurs types cellulaires comprenant les progéniteurs érythroïdes du foie fœtal et de la moëlle osseuse. Un de ces récepteurs a été cloné : c'est une glycoprotéine transmembranaire faisant partie de la famille

Factor	Size (in mouse)	Target Cells	Producing Cells
Granulocyte/ macrophage CSF (GM-CSF)	23,000 daltons	GM progenitor cells	T lymphocytes, endothelial cells, fibroblasts
Granulocyte CSF (G-CSF)	25,000 daltons	GM progenitor cells and neutrophils	macrophages, fibroblasts
Macrophage CSF (M-CSF)	70,000 daltons (dimer)	GM progenitor cells and macrophages	fibroblasts, macrophages, endothelial cells

**Figure 18** : Tableau reprenant les différents CSF, leur taille, leurs cibles cellulaires et les cellules productrices (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).



**Figure 19** : Différentes formes de TNF et récepteurs au TNF (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).



des récepteurs aux cytokines. La transduction du signal passe par l'homodimérisation et l'activation de la janus kinase 2 (Jak-2) (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

#### 6.5. Les facteurs stimulant les colonies (CSF).

Les facteurs stimulant les colonies de granulocytes et/ou de macrophages (CSF) reprennent différentes glycoprotéines stimulant la différenciation des précurseurs de cellules sanguines. On a le granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF), le granulocyte CSF (G-CSF), le macrophage CSF (M-CSF), appelé aussi facteur 1 stimulant les colonies (CSF-1) et le multi CSF qui est identique à l'interleukine 3 (*figure 18*). La principale source de CSF sont les lymphocytes T activés par un antigène, mais les monocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales en produisent aussi après une stimulation appropriée (Williams, 1992).

#### 6.6. Le facteur de nécrose des tumeurs.

Il y a deux facteurs de nécrose des tumeurs (TNF) : le  $\text{TNF}\alpha$  et le  $\text{TNF}\beta$  (*figure 19*).

Le facteur de nécrose des tumeurs  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) est une protéine de 17 kDa produite par les macrophages en réponse à une variété de stimuli incluant les mitogènes, les bactéries, les virus et les parasites. Le  $\text{TNF}\alpha$  est aussi produit par les lymphocytes B et T, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les seins, les ovaires, les astrocytes, les cellules de Kupffer, les cellules de l'épiderme, les adipocytes et les cellules de la granulosa (Aggarwal, 1992 ; Spriggs et al., 1992). In vivo, le  $\text{TNF}\alpha$  est une cytokine multipotentielle avec une large gamme d'effets biologiques. Il possède une activité anti-tumorale contre certaines tumeurs solides, mais induit aussi la tumorigenèse. Il peut se lier à deux récepteurs (TNF-R) appelés p60 et p80. Les principales actions du TNF sont médiées par le récepteur p60. Un des rôles du récepteur p80 est de moduler la croissance de certaines cellules.

Le  $\text{TNF}\beta$  est une protéine de 25 kDa produite par les lymphocytes suite à différents stimuli antigéniques ou viraux. Outre sa forme sécrétée, il peut s'associer avec une protéine transmembranaire,  $\text{LT}\beta$ , pour former un complexe membranaire hétérodimérique. Il peut se lier au deux TNF-R avec des affinités comparables à celles de  $\text{TNF}\alpha$  (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994). Le  $\text{TNF}\beta$  a un spectre d'activités allant de la cytotoxicité à l'induction de l'expression de gènes cellulaires ou viraux et la promotion de la prolifération et/ou de la différenciation cellulaire (Paul et Ruddle, 1988). Ces activités multiples affectent beaucoup de types cellulaires, allant des lymphocytes aux cellules endothéliales, osseuses ou nerveuses.



### 6.7. Le facteur des cellules souches.

Le SCF (pour Stem Cell Factor) est une glycoprotéine de 30 kDa qui possède des activités biologiques très variées incluant les cellules hématopoïétiques, les mélanocytes, et les cellules germinales primordiales. Un autre nom pour ce facteur est le Kit-ligand car il se lie à un récepteur portant le nom de Kit. Il existe deux formes pour le SCF : une qui est sécrétée et l'autre qui est membranaire, les deux provenant du même gène dont le transcrit a subi un épissage alternatif.

Le récepteur au SCF, la protéine Kit, est un récepteur à activité tyrosine kinase. La protéine en elle-même a un poids moléculaire de 109 kDa tandis que celui de la forme glycosylée va de 145 à 160 kDa. La voie de transduction du signal passe notamment par la phosphorylation de la MAP2 kinase. (in : Guidebook to cytokines and their receptors, 1994).

Les actions du SCF sont multiples. Au départ, il a été identifié comme un facteur produit par les cellules hépatiques de rat agissant en synergie avec l'interleukine-6 (IL-6) ou le CSF-1 pour stimuler la formation de colonies à partir de cellules primitives progénitrices (Martin et al., 1990 ; Zsebo et al., 1990b). Plusieurs facteurs incluant le Kit-ligand (Huang et al., 1990) et le facteur de croissance des mastocytes (MGF) (Williams et al., 1990) ont été purifiés, clonés et montrés comme étant identiques au SCF. En combinaison avec d'autres facteurs de croissance, le SCF stimule la production de cellules myéloïdes (Martin et al., 1990), lymphoïdes (McNiece et al., 1991), mégakaryocytiques (Briddell et al., 1991) et érythroïdes (Martin et al., 1990).

### 6.8. Les interférons.

On distingue deux familles d'interférons (IFN) : les interférons de type 1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  et  $\tau$ ) et les interférons de type 2 ( $\gamma$ ).

Les IFN de type 1 forment une famille de protéines de 165-172 acides aminés qui sont produits par les leucocytes (IFN $\alpha$ ) et les fibroblastes (IFN $\beta$ ). L'IFN $\omega$  et l'IFN $\tau$  (ou trophoblastine) font aussi partie de cette famille et sont respectivement produits par les lymphocytes et les embryons de ruminants. Les interférons ont toute une série d'effets antiviraux, antiprolifératifs et immunomodulateurs. Ils sont produits en réponse à une infection virale, bactérienne, mycoplasmaïque,... aussi bien qu'en présence de certaines cytokines incluant le CSF-1, l'IL-1, l'IL-2 et le TNF $\alpha$ . Ils lient le récepteur de type I et initient ainsi différentes réponses cellulaires.

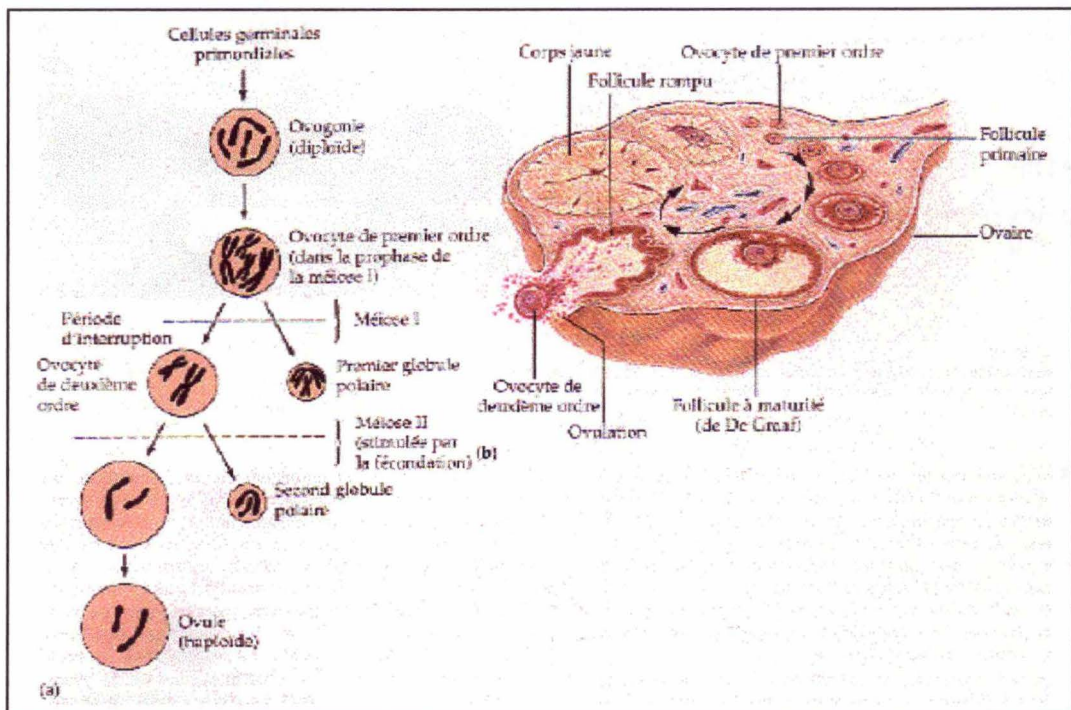
L'IFN $\gamma$  est une glycoprotéine qui est sécrétée par les lymphocytes T et les cellules natural killer. Cette molécule possède beaucoup d'activités biologiques in vitro différentes : actions antivirale et antiproliférative, activation de macrophages, induction des complexes



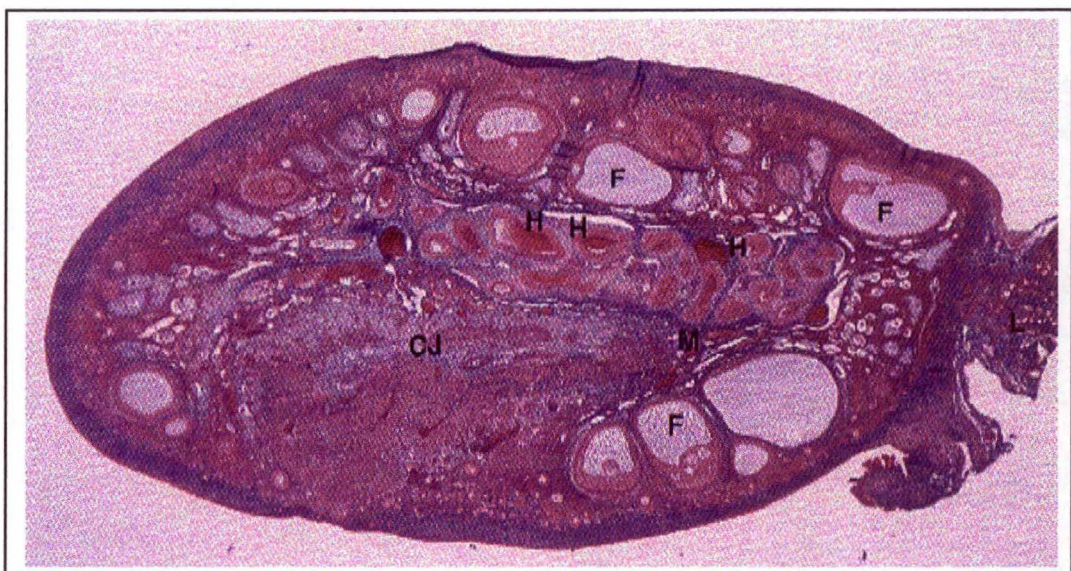
---

majeurs d'histocompatibilité de type I et II. Il joue un rôle primordial dans les processus de défense et d'inflammation (Williams, 1992).

Dans le chapitre II, les effets de l'IFN $\tau$  seront développés principalement dans le cadre du développement embryonnaire.



**Figure 20** : L'ovogenèse : (a) rappel de la corrélation entre l'ovogenèse et la méiose, (b) coupe transversale d'un ovaire humain (in : Biologie, 1995).



**Figure 21** : Coupe transversale d'un ovaire de guenon :

- CJ : corps jaune,
  - F : follicule,
  - H : artère hélicine,
  - L : ligament large,
  - M : médullaire (zone centrale du stroma ovarien)
- (in : Histologie fonctionnelle, 1995).



**CHAPITRE II :**  
**L'HORMONE ET LES FACTEURS DE CROISSANCE**  
**DANS LA REPRODUCTION.**

**I. DANS L'OVAIRE.** (*Figures 20 et 21*)

**1. Dans le follicule.**

**1.1. Lieux de synthèse des facteurs de croissance.**

L'IGF-I est synthétisé intensément par les cellules de la granulosa (Monget, 1993) et aussi par les cellules thécales. L'IGF-II est synthétisé par les cellules thécales dans les petits follicules antraux. Le TGF $\alpha$  est lui aussi synthétisé par les cellules thécales et sa concentration diminue dans les follicules préovulatoires. L'inhibine est synthétisée par les cellules de la granulosa (Besnard et al., 1997).

Le TGF $\beta$  est aussi sécrété par les cellules de la thèque et sa production peut être stimulée par deux voies : l'une impliquant la protéine kinase C (PKC), l'autre initiée par une stimulation de l'EGF, et impliquant l'activation de la MEK (pour Mitogen activated protein kinase Kinase) (Mau et May, 1997). D'autre part, les gonadotropines FSH-like (comme la PMSG, pour Pregnant Mare Serum Gonadotropin) stimulent l'expression des TGF $\beta$ -RII dans les follicules antraux et préantraux (Roy et Carlson, 1997).

Le KGF et le HGF sont quant à eux produits par les cellules thécales (Parrott et Skinner, 1997). Le VEGF est synthétisé par les péricytes dans les follicules et le corps jaune (Doraiswamy et al., 1997) ainsi que par les cellules de la granulosa (Neulen et al, 1995).

La GH, elle, est principalement synthétisée et sécrétée par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse (Brown, 1994) et aussi durant la gestation par le placenta (Bauman, 1992).

**1.2. Développement et métabolisme du follicule.**

Au niveau des cellules de la granulosa, l'EGF, le TGF $\alpha$ , le bFGF et l'IGF-I stimulent la prolifération tandis que le TGF $\beta$  l'inhibe. L'IGF-I stimule aussi leur différenciation et l'EGF, le bFGF et l'activine A l'inhibent. Au niveau de la thèque, le TGF $\alpha$  possède un effet stimulateur sur la prolifération, contrairement au TGF $\beta$  qui inhibe la prolifération mais



stimule la différenciation avec l'inhibine. Le TGF $\alpha$  et l'activine A quant à eux inhibent la différenciation des cellules thécales (Besnard et al., 1997). Les actions stimulatrices ou inhibitrices sur la prolifération des cellules granulosales et thécales se répercutent bien sûr directement sur la croissance folliculaire.

### 1.2.1. La GH.

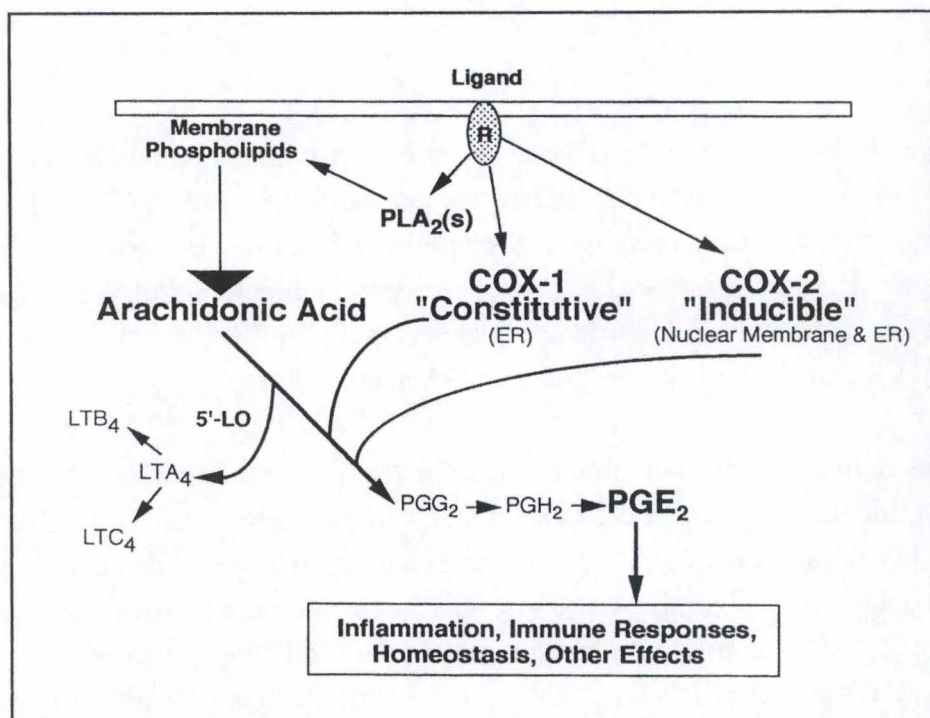
Une action directe de la GH sur l'ovaire est envisagée depuis la découverte de la localisation de son récepteur dans différents compartiments ovariens. Chez le mouton, les GH-R sont exprimés dans la membrane des cellules granuleuses de petits follicules, c'est-à-dire du stade de follicule primordial au stade de petit follicule antral. Le GH-R est moins abondant au niveau des cellules thécales (Eckery et al., 1997). Chez l'homme, on retrouve aussi des GH-R dans le corps jaune (Sharara et Nieman, 1994).

Les nombreux résultats obtenus quant aux effets de l'administration de GH sur la croissance folliculaire et les taux d'ovulation sont variables selon l'espèce étudiée, la durée du traitement, la dose administrée et la période du cycle œstral au cours de laquelle le traitement a lieu. Chez la brebis, l'administration de GH augmente significativement le nombre de follicules de 2,1 à 3,0 mm et diminue la population de follicules plus petits (Perrad, 1998). L'inverse est observé chez la vache (Gong et al., 1991 ; 1993a ; 1993b) et le rat (Spicer et al., 1992) où l'hormone augmente le recrutement folliculaire pour la croissance sans affecter les populations de follicules plus larges.

La GH joue donc un rôle capital dans les premiers stades de la folliculogénèse en ayant un effet stimulant sur la croissance folliculaire, même si ses effets sur l'activité ovarienne varient en fonction de la période du cycle. L'action de cette hormone peut être modulée par des facteurs variant avec l'état physiologique de l'animal (Perrad et al., 1996b). Elle semble capable de stimuler la croissance folliculaire d'elle-même, peut-être par une action sur les IGF, les IGF-BP ou en augmentant le nombre de récepteurs cellulaires (Bister et al., 1994). En plus d'augmenter la croissance folliculaire, la GH exogène réduit la sélection folliculaire et la dominance (Perrad et al., 1995). Elle augmente en outre le taux d'ovulations (Perrad et al., 1994).

La GH peut agir directement sur l'ovaire par une fixation sur son récepteur, ou en augmentant la libération d'IGF-I dans le sang qui agit alors selon un mode endocrine (Monget, 1993). Le mode d'action de la GH exogène sur les différentes étapes du développement folliculaire s'opère indépendamment des gonadotropines hypophysaires, leurs taux n'étant pas modifiés lorsque la GH est administrée à des brebis (Tannetta et al., 1997) ou à des vaches (Schemm et al., 1990 ; Gong et al., 1991).





**Figure 22** : Voie de synthèse des prostaglandines et des leucotriènes :

COX : cyclooxygénase, 5'-LO : 5'-lipoxygénase,  
 LT : leucotriène, PG : prostaglandine, R : récepteur,  
 ER : réticulum endoplasmique, PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>  
 (in : Sphingolipid-mediated signal transduction, 1997).

Des études *in vitro* indiquent une action directe de la GH sur la stéroïdogenèse ovarienne. Ainsi, l'addition de GH à des cellules granulosales humaines a pour effet d'augmenter à la fois la production de progestérone et d'œstradiol (Mason et al., 1990 ; Doldi et al., 1996). De même, la GH administrée *in vivo* module la sécrétion de stéroïdes *in vitro*. Cette hormone peut agir indirectement sur l'ovaire, via des facteurs autres que l'IGF-I et l'insuline ou directement par la modulation du nombre de récepteurs cellulaires ou de l'activité des enzymes responsables de la synthèse de stéroïdes (Perrad et al., 1996a). Chez la plupart des espèces, la GH potentialise les effets de la FSH en augmentant, entre autres, les récepteurs cellulaires de LH et l'activité cytochrome P<sub>450</sub> aromatasase des cellules granulosales (Ando et al., 1994).

### 1.2.2. Les IGF.

Les IGF stimulent la prolifération des cellules de la granulosa et possèdent une action coordonnée avec la FSH (Hormone stimulant les follicules) pour la différenciation de ces cellules (Besnard et al., 1997). Ils vont ainsi permettre l'induction de l'activité aromatasase provoquant la production d'œstradiol par les cellules de la granulosa à partir des androgènes produits par les cellules thécales (Davis et al., 1990 ; Campbell et al., 1995 ; Noël et al., 1998a). Par contre, une préstimulation inhibe l'activité aromatasase et la sensibilité à la LH et à la FSH de follicules prélevés en anœstrus (Noël et al., 1998b). De plus, ils stimulent l'expression des récepteurs à la LH (LH-R) par les cellules de la thèque (Davis et al., 1990 ; Magoffin et Weitsman, 1994). L'IGFBP-3 semble aussi contrôler les fonctions des cellules endothéliales au niveau de la thèque folliculaire (Fraser et al., 1997). Enfin, l'insuline et les IGF interviennent dans la prolifération et la différenciation de cellules interstitielles de la thèque (TIC) (Duleba et al., 1997 ; Duleba et al., 1998).

### 1.2.3. Les TGFβ.

Un des principaux modes d'action des TGFβ est de contrôler l'expression de la follistatine (qui peut elle-même moduler l'action des TGFβ) capable de lier l'activine (Sargüea et al., 1996). D'autre part, le TGFα (un membre de la famille des EGF) stimule la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2), tandis que les TGFβ l'inhibent. Ceci va provoquer la production de prostaglandines (PG ; *figure 22*) qui jouent un rôle au niveau de la régulation de l'effet mitogénique des facteurs de croissance (Li et Tsang, 1996).

Un autre exemple intéressant des actions des TGFβ est le suivant : les cellules de la granulosa qui synthétisent de l'œstradiol vont par ce fait inhiber la production de TGFβ par les TIC (cellules interstitielles de la thèque). Or les TGFβ inhibent la production d'androgènes par les cellules de la thèque. Vu que la production de TGFβ est inhibée, l'action de l'œstradiol sera donc de stimuler la synthèse d'androgènes qui servent de substrat à sa propre synthèse par l'aromatasase. Tout ceci a été démontré *in vitro* chez le rat (Magoffin et al., 1995). D'autre



part, après stimulation à la LH/FSH, les taux de progestérone sécrétés par des follicules préstimulés avec du TGF $\beta$  sont augmentés (Noël et al., 1994).

Le GDF-9 (Growth Differentiation Factor-9), qui fait partie de la famille des TGF $\beta$ , intervient pour coupler l'ovogenèse et la folliculogénèse. Si le gène codant pour le GDF-9 subit une délétion, on observera alors une stérilité des femelles (Albertini et al., 1998). Le rôle du GDF-9 au niveau des ovaires des ruminants domestiques semble se situer surtout au niveau de la folliculogénèse, principalement dans les stades précoces de la croissance folliculaire (Bodensteiner et al., 1999).

L'inhibine quant à elle exerce probablement un « feed-back » négatif sur la production de FSH car une immunisation de l'animal contre l'inhibine  $\alpha$  augmente le taux d'ovulations (Morris et al., 1995).

#### 1.2.4. Les facteurs de croissance spécifiques.

Le bFGF et le VEGF stimulent l'angiogenèse durant la folliculogénèse, tandis que le NGF augmente l'innervation folliculaire (Van Den Hurk et al., 1997).

Le KGF (un membre de la famille des FGF) et le HGF produits par les cellules thécales, ainsi que le KL (Kit-Ligand ou SCF) produit par les cellules de la granulosa interagissent pour exercer un « feed-back » positif pour réguler le développement folliculaire. Ainsi, différentes hormones (œstrogènes, hormone gonadotrope chorionique (hCG), FSH) peuvent contrôler la croissance folliculaire via l'expression du KGF, du HGF et du KL. Par ailleurs, le KL est nécessaire et suffisant pour induire le développement du follicule primordial dans l'ovaire (Parrott et Skinner, 1997).

Le tissu ovarien exprime aussi des GM-CSF et des GM-CSF-R (le récepteur) au niveau du follicule et du tissu lutéal. Les GM-CSF ont un rôle autocrine et paracrine et influencent les stades tardifs du développement folliculaire (pour le GM-CSF thécal) et différentes fonctions ovariennes (pour le GM-CSF lutéal) (Zhao et al., 1995).

#### 1.3. Croissance folliculaire : atresie et dominance.

Lors d'une vague de croissance folliculaire, toute une série de follicules comencent à se développer, mais tous n'arriveront pas jusqu'au stade de l'ovulation. En effet, un (ou plusieurs suivant les espèces) follicule va dominer les autres et se développer à leur détriment. On l'appelle le follicule dominant, les autres sont dits subordonnés et subiront l'atresie folliculaire qui est une dégénérescence. Plusieurs facteurs de croissance semblent impliqués dans ces processus de dominance et d'atresie folliculaire. On retrouve les IGF et leurs IGFBP, les EGF,...



### 1.3.1. L'action des IGF et des IGFBP.

Les IGF et les IGFBP sont exprimés au niveau du follicule. L'IGF-II est par ailleurs plus exprimé dans les gros follicules (Ward et al., 1997). On retrouve aussi dans le fluide folliculaire les IGFBP-2, -3, -4 et -5. Or, lors de la croissance folliculaire, on observe dans le fluide folliculaire une petite augmentation de l'IGFBP-3 et une diminution des IGFBP de moins de 40 kDa (2, 4 et 5 chez le mouton), ce qui est lié à une diminution de leur synthèse et une augmentation de leur dégradation (pour L'IGFBP-4). Par contre, lors de l'atrésie, on peut mesurer une augmentation des IGFBP-2, -3, -4 et une diminution de l'IGFBP-3. On a pu en effet détecter une diminution des activités protéolytiques envers les IGFBP-4 et -5 dans les follicules atrétiques (De la Sota et al., 1996 ; Besnard et al., 1997; Yuan et al., 1998).

Cette diminution des IGFBP de moins de 40 kDa lors du développement folliculaire dans les larges follicules antraux est donc responsable d'une augmentation de la concentration en IGF et par conséquent d'une amplification de l'action des gonadotropines, les IGF augmentant celle de la FSH au niveau du follicule. On peut se souvenir du fait que la FSH provoque les vagues de croissance folliculaire, tandis que la LH (Hormone Lutéinisante) stimule le développement folliculaire terminal et l'ovulation (Choi et al., 1997; Besnard et al., 1997). D'autre part, la GH, agissant par l'intermédiaire de l'IGF-I de production locale, va diminuer l'apoptose des cellules folliculaires. De plus, une augmentation d'IGFBP-2 dans le follicule entre les jours 5 et 7 après l'oestrus chez le porc augmente l'apoptose des cellules granulosales et l'atrésie folliculaire. L'IGF-I agit donc comme un facteur de survie folliculaire (Guthrie et al., 1995 ; Eisenhauer et al., 1995).

En conclusion, les IGF stimulent, de par leur effet au niveau de l'action de la FSH, le lancement des vagues de croissance folliculaire. Les concentrations variables des IGFBP vont permettre à la dominance et à l'atrésie folliculaire de prendre place. D'autre part, l'IGF-II produit dans les follicules et le corps jaune est probablement un régulateur important de la folliculogénèse agissant via les récepteurs IGF-RI (Dawson et al., 1997).

### 1.3.2. Les actions des autres facteurs de croissance.

Oltre les IGF et les IGFBP, d'autres facteurs de croissance interviennent au niveau des vagues de croissance folliculaire. L'EGF joue un rôle dans l'induction de l'atrésie. L'inhibine, synthétisée par les cellules de la granulosa, voit sa concentration augmenter avec la taille du follicule (Besnard et al., 1997). L'activine A et B diminuent la production des IGFBP-4 et -5 (Choi et al., 1997). Les FGF et EGF participent tous deux à l'initiation des vagues de croissance folliculaire (Besnard et al., 1997).

D'autre part, la diminution du taux de TGF $\beta$  et l'augmentation des taux de bFGF et de FGF-R dans les cellules thécales des follicules dominants se fait en parallèle à une



augmentation de l'expression des FSH-R et des LH-R, ainsi que de l'activité aromatasase. Ceci suggère que ces facteurs de croissance jouent un rôle important dans la sélection et dans la dominance folliculaire (Schams et al., 1997).

## **2. Dans le corps jaune.**

Le VEGF stimule la vascularisation du corps jaune et est synthétisé par les cellules de la granulosa (Neulen et al., 1995 ; Doraiswamy et al., 1998). Il est aussi produit par les péricytes dans les follicules et le corps jaune et a donc un rôle critique dans les événements angiogéniques : il permet la transformation du follicule en un corps jaune très vascularisé (Doraiswamy et al., 1997). Etant donné son action, le VEGF va aussi stimuler le développement du corps jaune et la production de progestérone (Anasti et al., 1998).

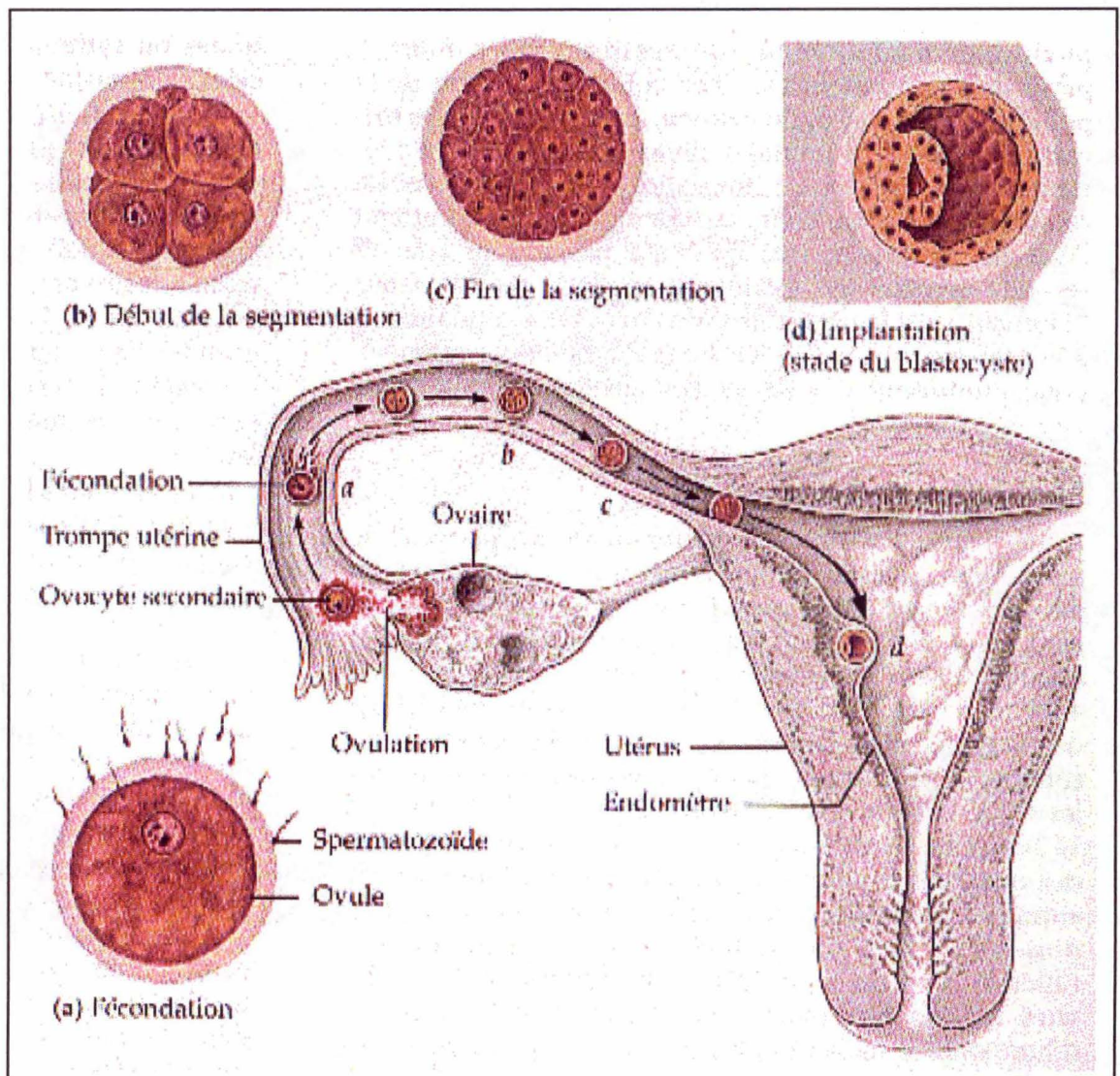
On a pu montrer la présence des mRNAs des IGFBP-2, -3 et -4 dans des extraits de corps jaune (Woad et al., 1997). L'IGFBP-3 semble contrôler les fonctions des cellules endothéliales de ce tissu (Fraser et al., 1997). L'IGF-I y stimule la lutéinisation (Pescador et Murphy, 1998) et la sécrétion pulsatile in vitro de progestérone (Khan-Dawood et al., 1994). Ainsi, plusieurs faits indiquent que le système IGF joue un rôle décisif pour le contrôle autocrine et paracrine du corps jaune (Zhaoping et al., 1998). La GH joue elle-même un rôle important dans la fonction lutéale (Ikeda et al., 1997).

Contrairement à l'IGF-I qui stimule la lutéinisation, l'EGF induit la mitogenèse de la granulosa et son maintien dans un stade indifférencié. Ils possèdent donc dans la formation du corps jaune des actions antagonistes (Pescador et Murphy, 1998).

Le TGF $\beta$ -RII, exprimé dans les follicules antraux et préantraux (Roy et Carlson, 1997) participe à la lutéinisation (Wehrenberg et Rune, 1998).

Un TNF $\alpha$ -R est produit au niveau du corps jaune durant tout le cycle. Le TNF $\alpha$  joue donc un rôle au niveau de la phase lutéale et de la lutéolyse (Sakumoto et al., 1998). Ce sont les macrophages qui sont la source principale du TNF $\alpha$  dans le corps jaune (Zhao et al., 1998).

Le KGF synthétisé par le corps jaune permet une communication paracrine entre les cellules de la thèque et les petites cellules lutéales (Salli et al., 1998).



**Figure 23** : Evénements qui suivent la fécondation (chez la femme) :

- (a) le zygote migre vers l'utérus,
- (b) le zygote commence à se diviser après 24 à 36 heures,
- (c) l'embryon atteint l'utérus et y flotte librement quelques jours,
- (d) au stade blastocyste, l'embryon s'implante dans l'endomètre, soit sept jours après l'ovulation (in : Biologie, 1995).



## II. DANS LA NIDATION, LA PLACENTATION ET LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE. (Figure 23)

### 1. Dans le développement embryonnaire.

#### 1.1. Les IGF.

Les IGF produits par la mère pourraient être régulés par les IGFBP embryonnaires pour aider au développement préimplantatoire de l'embryon (Winger et al., 1997). L'IGF-RI et les IGF I/II exprimés dans l'oviducte forment un système autocrine et paracrine permettant la mise en place d'un milieu adéquat pour le développement embryonnaire. L'IGF-I en particulier, produit dans l'oviducte et l'utérus, stimule le développement embryonnaire du stade morula au stade blastula. En fait, il se lie aux embryons préimplantatoires et démarre le développement embryonnaire précoce. Il a donc un rôle dans l'interaction mère-embryon (Herrler et al., 1997 ; Herrler et Beier, 1995 ; Lighten et al., 1997 ; 1998). L'insuline aussi intervient en stimulant les clivages embryonnaires (Gandolfi, 1992).

#### 1.2. Les EGF.

Des  $TGF\alpha$  endogènes peuvent fonctionner comme des facteurs de survie cellulaire lors du développement préimplantatoire de l'embryon en réduisant l'apoptose des cellules (Brison et Schultz, 1997a ; 1997b ; 1998). Le  $TGF\alpha$ , agissant via l'EGF-R, stimule la prise d'acides aminés et leur incorporation par l'embryon, l'expansion du blastocœle et la synthèse de protéines dans l'espace périvitellin et le blastocœle (notamment des gélatinases). Cette action se déroule surtout entre les jours 3 et 8 de gestation pendant lesquels on observe une augmentation de la concentration de  $TGF\alpha$  et d'IGF-II (Gandolfi, 1992).

#### 1.3. Les PDGF.

Le PDGF stimule l'embryon et y est présent de même que dans l'épithélium de l'oviducte (Gandolfi, 1992).

#### 1.4. Les FGF.

Le bFGF est aussi présent dans l'embryon et dans l'épithélium de l'oviducte et stimule la formation du blastocyste (Gandolfi, 1992). Le FGF permet entre autres une régulation autocrine et paracrine au niveau de l'oviducte comprenant les cellules de l'oviducte et les complexes ovocyte-cumulus (Gabler et al., 1997 ; Gabler et Einspanier, 1998). Il possède donc un rôle dans le développement précoce de l'embryon (Hrabé de Angelis et al., 1995).

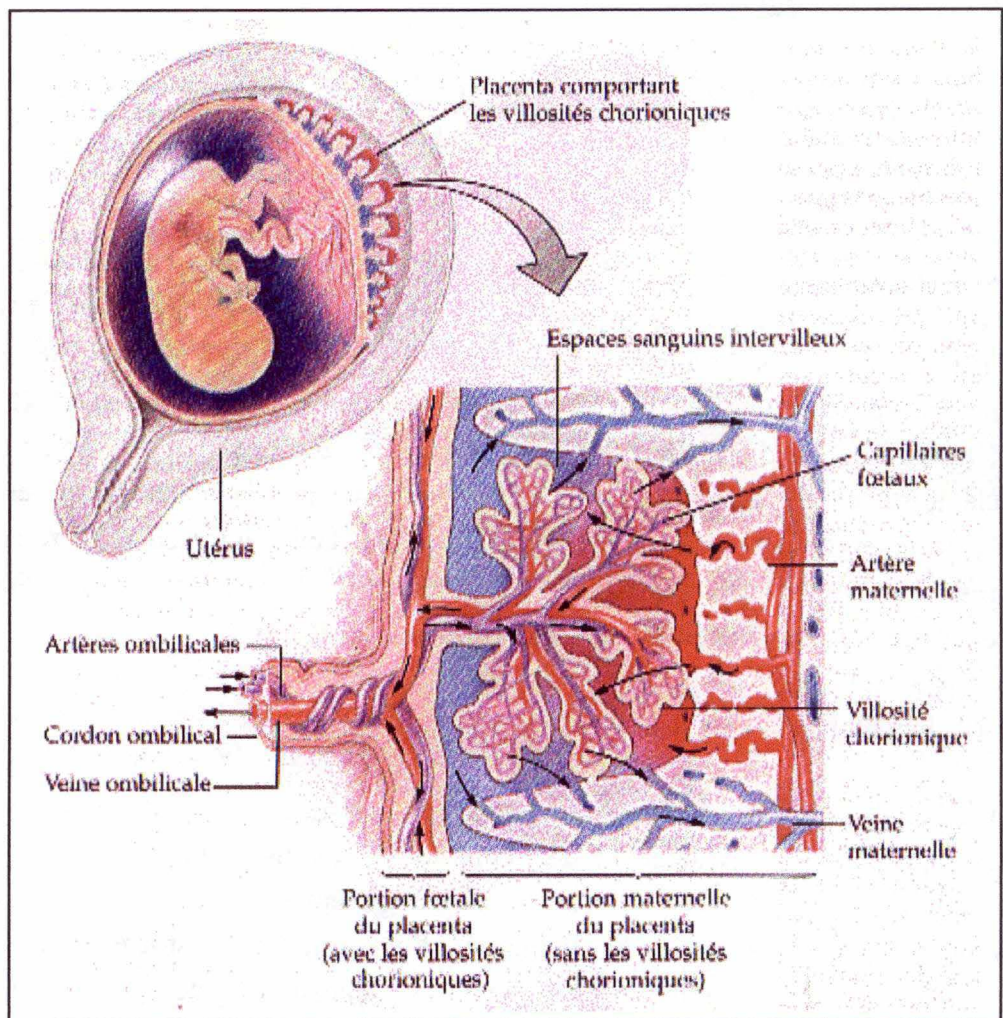


Figure 24 : Placenta et circulation fœtale : pendant les deux premiers mois de développement, l'embryon est nourri directement par l'endomètre ; à partir du troisième mois et jusqu'à la naissance, le placenta assure le transport des nutriments vers l'embryon (qui porte alors le nom de fœtus) et des déchets en provenance du fœtus (in : Biologie, 1995).



### 1.5. Les facteurs de croissance spécifiques.

Le VEGF joue un rôle important au niveau de l'angiogenèse fœtale (Redmer et al., 1997).

Le  $TNF\alpha$  inhibe la prolifération et la différenciation des cellules souches embryonnaires (ou ESC pour Embryo Stem Cell) dans les corps embryonnaires (Wuu et al., 1998). Il diminue ainsi l'aptitude des embryons à se différencier en fœtus après l'implantation (Wuu et al., 1999).

## **2. Dans la nidation, la placentation et la gestation.** (Figure 24)

### 2.1. Les IGF.

Les deux somatomédines sont exprimées durant la phase de formation de la déciduale et l'expression d'IGF-I et d'IGFBP-4 est associée avec la décidualisation des cellules du stroma utérin (Henemyre et Markoff, 1998). Elles possèdent une fonction autocrine et paracrine dans la différenciation de l'endomètre suite à l'implantation de l'embryon ainsi que dans la croissance et l'invasivité du trophoblaste (Correia da Silva et al., 1993 ; Hamilton et Lala, ). L'IGFBP-5 est synthétisée dans les tissus utérins et placentaires et est un régulateur important de la croissance placentaire médiée par les IGF (Reynolds et al., 1997). L'IGFBP-2 est aussi un régulateur des actions de l'IGF-II au niveau de l'utérus (Badinga et al., 1997).

Chez le fœtus, les taux d'IGF-I/II et des IGFBP-2/-3 augmentent avec le temps de gestation, et, chez la mère, c'est le taux d'IGF-I qui augmente (Langford K et al., 1998). Le taux d'IGF-II quant à lui régule la composition des tissus fœtaux et extra-embryonnaires (Gardner et al., 1999). Ceci implique un rôle important du système IGF dans la gestation.

### 2.2. Les EGF.

Les EGF (EGF,  $TGF\alpha$ , HB-EGF et amphiréguline) sont présents dans l'utérus et peuvent agir sur les EGF-R situés sur les blastocystes. Ils interviennent dans l'implantation de l'embryon (Dey, 1995). De plus, l'EGF est exprimé par l'endomètre et l'EGF-R se retrouve sur l'allantochoirion fœtal et l'endomètre maternel. Il y a donc une influence de l'EGF au niveau de la croissance de ces deux tissus (Lennard et al., 1998). D'autre part, le HB-EGF stimule la prolifération et la différenciation de l'endomètre humain in vitro (Austin et al., 1998).

On a pu montrer qu'il existe une interaction entre l'œstradiol et l'EGF dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation de l'endomètre. En effet, l'EGF et



l'œstradiol stimulent tous deux la croissance utérine et vaginale chez la souris, mais si on utilise des anticorps contre l'EGF, on inhibe l'action de l'œstradiol (Mellor et Thomas, 1995).

L'importance des EGF durant la gestation chez la truie est démontrée par l'exemple qui suit : il existe dans la lumière utérine une forme tronquée de l'EGF-R, et des taux élevés de ce récepteur coïncident avec un établissement de gestation raté (Kliem et Fischer, 1997). D'autre part, la présence de ce récepteur aux EGF seul au niveau de l'endomètre utérin porcin montre que les EGF du fluide utérin ont des effets sur les embryons et non sur la paroi utérine (Kliem et al., 1998).

Enfin, L'EGF intervient au niveau de la placentation pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales des artères fœtoplacentaires (Zheng et al., 1997).

Le TGF $\alpha$  établit un échange d'informations de type juxtacrine entre les cellules de l'endomètre et entre les cellules de l'épithélium luminal et les cellules de l'embryon préimplantatoire, toutes ces cellules exprimant l'EGF-R (Bush et al., 1998).

### 2.3. Les TGF $\beta$ .

Les TGF $\beta$  (1, 2 et 3) ainsi que les TGF $\beta$ -RI/II se retrouvent dans le conceptus préimplantatoire et périimplantatoire et possèdent un rôle dans l'implantation (Gupta et al., 1997) et dans le développement du conceptus (Gupta et al., 1998a ; 1998b ; Nowak RA, 1999, Flores et al., 1998) en intervenant dans les interactions autocrines et paracrines entre l'utérus et le conceptus (Gupta et al., 1998a).

D'autre part, le TGF $\beta$ -1, présent dans le liquide séminal et transféré à l'utérus lors de la reproduction, stimule la production de GM-CSF ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires au niveau de l'utérus. Il va donc provoquer des changements immunologiques de l'utérus durant la période préimplantatoire (Tremellen, 1998).

### 2.4. Les FGF.

L'utérus synthétise les FGF-1 et -2, et cette synthèse est régulée par l'œstradiol. Ces facteurs de croissance possèdent différentes localisations dans l'utérus (Samathanam et al., 1998). Ils interviennent aussi pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales des artères fœtoplacentaires (Zheng et al., 1997).

Tout comme on trouve des KGF-R dans l'endomètre utérin et dans la peau fœtale (Liu et al., 1997), on trouve aussi le KGF et ses récepteurs dans l'utérus (Rocca et Koos, 1997), l'oviducte et le vagin (Slayden et al., 1997) où il stimule la prolifération des cellules endothéliales.



### 2.5. L'interféron $\tau$ .

L'IFN $\tau$  joue un rôle primordial dans l'établissement de la gestation (Johnson et al., 1998) : c'est un signal de reconnaissance de la gestation chez les ruminants (Spencer et al., 1996b). Il est synthétisé aux jours 12-13 de gestation chez la brebis et aux jours 14-17 de gestation chez la vache et le chèvre (Bazer et al., 1996).

L'ocytocine (OT) est responsable de la sécrétion épisodique de la prostaglandine F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) par l'utérus des ruminants. Pour rappel, la PGE2 est lutéotrope (elle stimule le développement du corps jaune et la production de progestérone) au contraire de la PGF2 $\alpha$  qui est lutéolytique. La PGE2 va donc permettre le maintien de la gestation tandis que la PGF2 $\alpha$  va l'empêcher. L'atténuation de la production de PGF2 $\alpha$  par l'IFN $\tau$  est donc essentielle pour la prévention de la lutéolyse durant la gestation chez les ruminants (Xiao et al., 1999). Par contre, L'IFN $\tau$  stimule la production de PGE2 (Asselin et al., 1997).

Cette action de l'IFN $\tau$  sur la synthèse des PG est due à une régulation de l'expression des récepteurs à l'ocytocine, eux-mêmes induisant la transcription de la COX-2 (cyclooxygénase-2 qui est la forme inductible d'une enzyme intervenant dans la synthèse des prostaglandines) et de la PGFS (PGF synthase) (Xiao et al., 1999). L'IFN $\tau$  va ainsi via IRF-2 (IFN $\tau$ -induced Regulatory Factor like 2) diminuer l'expression du récepteur aux œstrogènes et (directement ou indirectement) du récepteur à l'ocytocine par l'endomètre, ce qui empêche alors la sécrétion de PGF2 $\alpha$  qui est indispensable pour la lutéolyse (Bazer et al., 1996 ; Spencer et al., 1996a ; Spencer et Bazer, 1996 ; Bazer et al., 1997). On a d'ailleurs pu montrer que des injections intrautérines d'IFN $\tau$  altéraient l'expression des récepteurs à l'ocytocine et aux œstrogènes (Spencer et al., 1995a ; Spencer et al., 1995b).

En résumé, la synthèse d'IFN $\tau$  par le trophoblaste diminue, via une régulation de l'expression des récepteurs à l'ocytocine, de la COX-2 et de la PGFS, la synthèse de la PGF2 $\alpha$  au profit de la PGE2. Ceci va permettre un maintien du corps jaune et donc un maintien de la gestation.

L'IFN $\tau$  est aussi très important dans les différents aspects immunologiques de la gestation. Par exemple, il stimule l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de type I, mais pas ceux de type II (Todd et al., 1998). D'autre part, l'IFN $\tau$  régule la production de la bGCP-2 (bovine Granulocyte chemotactic protein-2) qui est un facteur important pour la détermination de l'environnement cytokinique dans l'utérus. De plus, la régulation de l'inflammation et de l'angiogenèse par la bGCP-2 en collaboration avec d'autre cytokines est nécessaire pour l'établissement de la gestation précoce et de l'implantation de l'embryon (Teixeira et al., 1997).



## 2.6. Les facteurs de croissance spécifiques.

Les couches épithéliales fœtales et maternelles produisent aussi du VEGF qui permet d'augmenter la croissance locale des capillaires pour obtenir un meilleur réseau vasculaire pour le transfert des nutriments et des déchets au niveau du placenta (Charnock-Jones et al., 1997 ; Redmer et al., 1997). Le VEGF a aussi un rôle dans le remodelage de l'endomètre pour l'implantation et la gestation (Koos et al., 1998). Enfin, le VEGF, en plus de son rôle angiogénique, stimule la prolifération des cellules du trophoblaste extravilleux durant le développement placentaire (Athanassiades et al., 1998).

La relaxine semble avoir un rôle dans la vascularisation de la muqueuse utérine en induisant la synthèse de VEGF et en provoquant ainsi l'angiogenèse au niveau de l'endomètre (Unemori et al., 1997 ; Grove et al., 1998). Par contre, le placenta sécrète le sFlt-1 qui est un antagoniste du VEGF, et qui est donc important dans la régulation des effets du VEGF et nécessaire pour une gestation réussie (Clark et al., 1998).

Le  $\text{TNF}\alpha$ , agissant via ses récepteurs, induit la croissance du compartiment spongiotrophoblastique du placenta, même s'il inhibe la croissance du trophoblaste le jour 3 de gestation (Rasmussen et al., 1997). La source principale de  $\text{TNF}\alpha$  utérin se situe dans les cellules mastocytaires (Roby et Hunt, 1995).

In vitro, le HGF stimule la prolifération et la migration des cellules épithéliales de l'endomètre, ce qui indique un rôle possible dans la régénération de l'endomètre utérin après les menstruations (Sugawara et al., 1997 ; Lindsey et Brenner, 1998).

Le CTGF (Connective Tissue Growth Factor), présent dans l'endomètre et la décidue utérine, ainsi que dans le trophoblaste, voit sa concentration augmenter avec le temps de gestation. Il stimule la prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes et a probablement un rôle dans la gestation et le développement embryonnaire (Uzumcu et al., 1998 ; Surveyor et Brigstock, 1998).



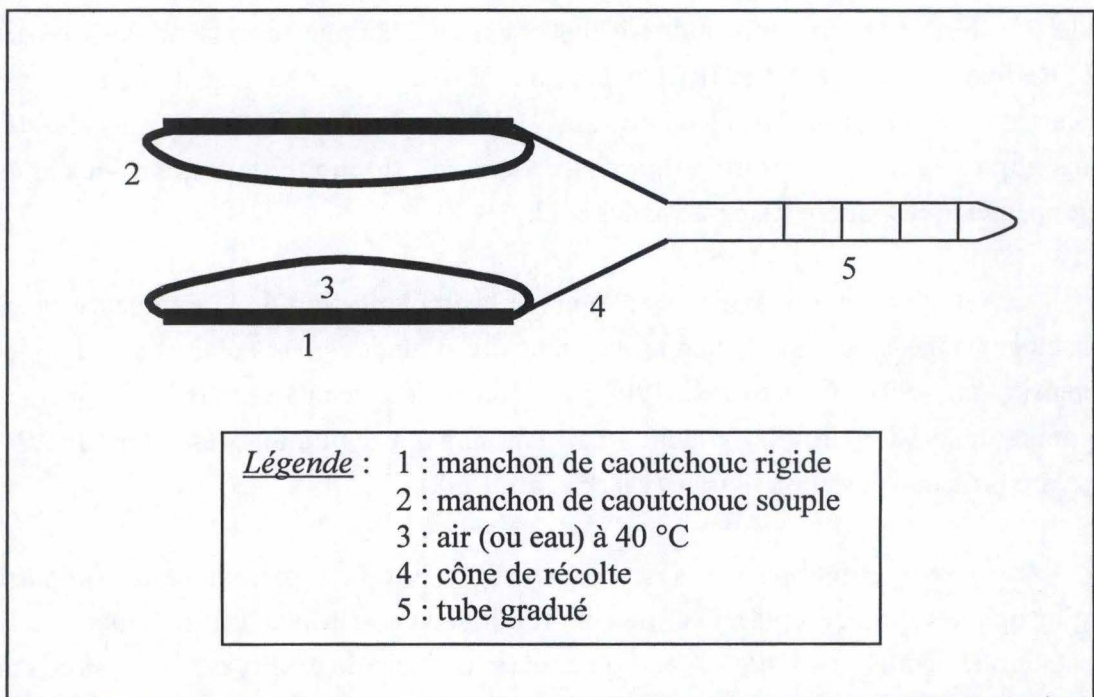


Figure 25 : Vagin artificiel pour le prélèvement du sperme.

### **CHAPITRE III :** **LA FIVETE (FECONDATION IN VITRO ET** **TRANSFERT D'EMBRYONS).**

#### **I. LA FIVETE.**

##### **1. La récolte des gamètes.**

###### **1.1. Les spermatozoïdes.**

Chez les animaux, il existe toute une série de techniques de récolte de sperme. La plus fréquente est celle du vagin artificiel (*figure 25*), constitué d'un manchon en caoutchouc rigide doublé à l'intérieur d'un manchon en caoutchouc souple. Entre les deux se trouve de l'air ou de l'eau à environ 40°C. Le tout est prolongé par un cône récolteur et un tube gradué ou un bidon pour les espèces à grand volume spermatique. Le vagin artificiel est placé sur le pénis du mâle au moment où il s'apprête à saillir une femelle en chaleur. La taille du vagin artificiel est bien sûr adaptée à la taille du pénis de l'animal.

Une autre technique utilisée uniquement chez le taureau et le bétail est l'électroéjaculation. Elle est utilisée si l'animal n'est plus capable de saillir ou s'il refuse le vagin artificiel. L'électroéjaculateur est un tube en métal avec deux lames métalliques qui constituent les électrodes. Après son introduction dans le rectum, des trains d'impulsions sont émis, de l'ordre de 100 Hz et 12 V. La stimulation se fait au niveau des vertèbres où se trouve la zone médullaire responsable du contrôle du réflexe d'éjaculation. La stimulation va provoquer l'érection, puis l'éjaculation suite à une stimulation prolongée. Cette technique reste stressante pour l'animal pour lequel elle provoque des douleurs musculaires.

Enfin, on trouve les techniques de massages chez le chien et le coq, ainsi que le condom chez les étalons qui refusent parfois le vagin artificiel (Bister, 1998).

###### **1.2. Les ovocytes.**

Pour la récolte des ovocytes, la méthode la plus fréquemment utilisée est le pick-up ovocytaire (OPU) qui consiste à aspirer le contenu des follicules antraux. Chez la femme, l'OPU se pratique sur des follicules préovulatoires avec des ovocytes mûrs, ce qui permet de passer outre la maturation in vitro des ovocytes. Chez les animaux, en général, l'OPU se pratique à n'importe quel moment du cycle. Elle nécessite alors une plus grande force





d'aspiration pour récolter l'ovocyte associé au cumulus oophorus (COC pour Complexe Ovocyte-Cumulus).

#### 1.2.1. Chez la femme.

Chez la femme, étant donné que l'on ne récolte que des ovocytes prêts à ovuler, on fait souvent un traitement hormonal destiné à provoquer une superovulation lors de laquelle on pourra récolter plusieurs ovocytes mûrs.

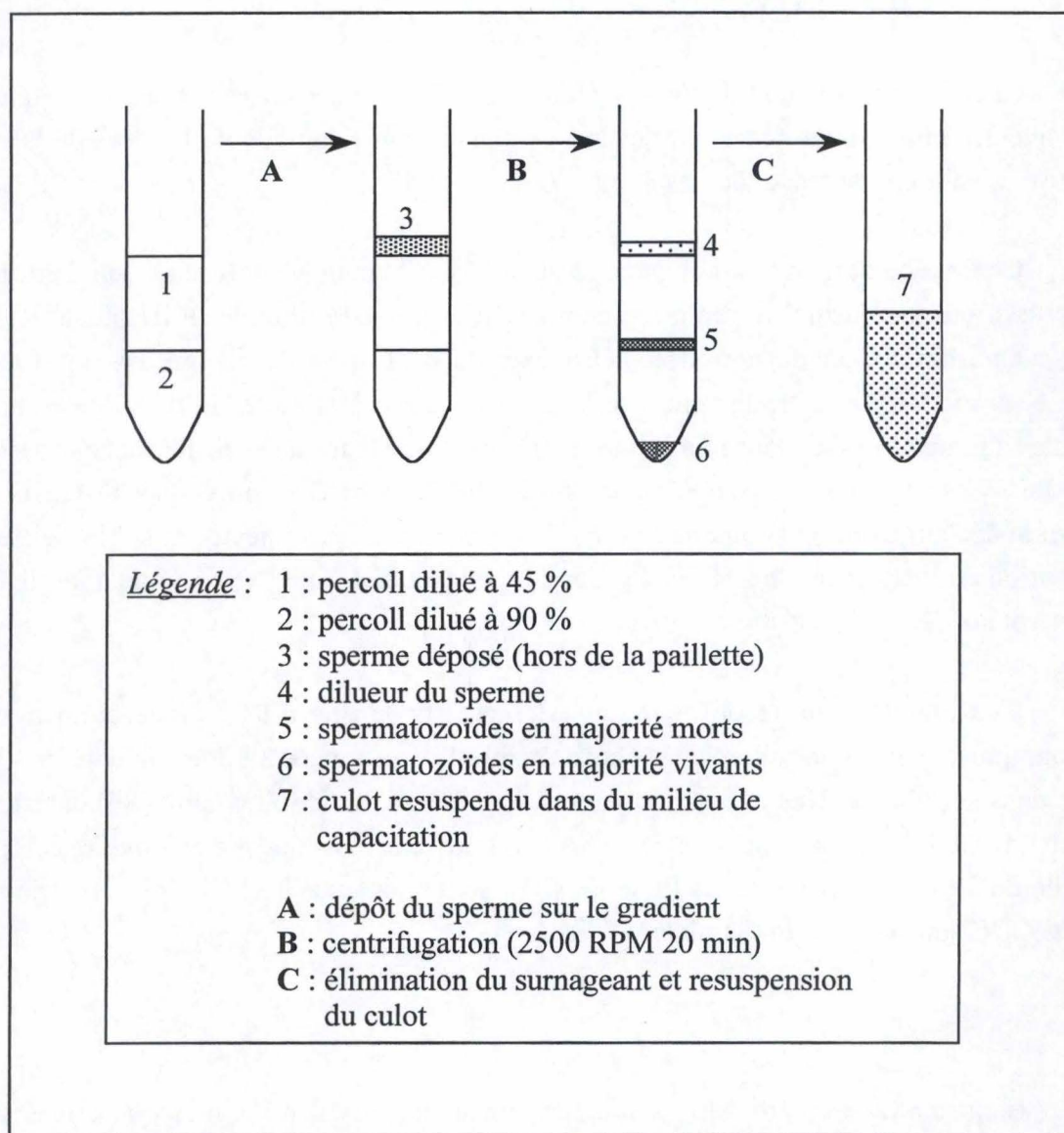
Ce traitement comprend en général de la hMG (human Menopausal Gonadotrophin) qui est extraite de l'urine de femme ménopausée et possède un effet FSH, et de la hCG (human Chorionic Gonadotrophin) qui est extraite de l'urine de femme enceinte et qui possède un effet LH. Le traitement à la hMG est destiné à stimuler le développement de follicules antraux. Lorsque leur nombre est suffisant et que leur diamètre approche les 16 mm (contrôle échographique), on passe à un traitement hCG. La hCG va provoquer l'ovulation en mimant la décharge préovulatoire de LH. Parfois, l'hCG n'est pas injectée et le biologiste suit l'apparition du pic naturel de LH via des dosages fréquents. L'OPU se pratique 4 à 6 h avant le moment normal de l'ovulation.

Une longue aiguille de ponction est fixée sur le dos d'une sonde endocavitaire d'échographie. Lorsque le follicule est choisi, l'aiguille est avancée à travers la paroi vaginale jusque dans le follicule. Une dépression permet d'aspirer le fluide folliculaire (FF) dans lequel se trouve le COC, puis, par une deuxième voie, on procède à un rinçage et à une réaspiration du follicule. Les tubes contenant le FF et les COC sont maintenus à 37°C. Enfin, on trie et on lave les COC sous hotte à flux laminaire.

#### 1.2.2. Chez les animaux.

En général, on ne procède pas à un traitement superovulatoire, bien que cela se fasse de plus en plus fréquemment. On va alors ponctionner des ovocytes qui ne sont pas encore matures pour ensuite procéder à leur maturation *in vitro*. Chez la vache, la ponction se fait par voie transvaginale. Chez les autres animaux (moutons, chèvre, porcs,...), cette ponction se fait par laparoscopie transabdominale, bien qu'une nouvelle technique d'OPU transvaginale aie été mise au point chez la chèvre (*figure 26*). Enfin, si on ne fait pas de ponction sur une femelle particulière, l'OPU peut se faire sur des ovaires provenant d'un abattoir, si ceux-ci ont été récoltés dans du liquide physiologique à 35-39°C et y restent moins de 6 h (Bister, 1998).





**Figure 27 :** Séparation des spermatozoïdes morts et vivants par la méthode du gradient de percoll.

## **2. La maturation ovocytaire in vitro.**

Les ovocytes ponctionnés dans des follicules qui ne sont pas préovulatoires doivent être maturés in vitro pour pouvoir être fécondés. On va tout d'abord trier les COC collectés. On ne conserve que ceux qui présentent un cumulus d'au moins deux couches cellulaires continues. Ils sont alors lavés dans du milieu stérile contenant des antibiotiques, ce qui permet d'éviter les risques de contamination, pour être ensuite transférés dans le milieu de maturation proprement dit. Ce milieu a une composition variable d'un laboratoire à l'autre. Il comprend un milieu de base (TCM199, Ham F10,...), plus de la LH et de la FSH (pour mimer le pic préovulatoire), de l'oestradiol et parfois du fluide folliculaire filtré.

Les boîtes de maturation in vitro (boîtes multipuits) sont ensuite placées dans une étuve à 39°C contenant 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'humidité relative. Le CO<sub>2</sub> permet un équilibre entre l'atmosphère gazeuse et le bicarbonate en solution dans le milieu, ce qui améliore le pouvoir tampon de l'ensemble. La maturation dure environ 20 h et on peut l'observer grâce au phénomène le plus visible qui est l'expansion du cumulus oophorus qui forme alors la corona radiata (maturation extraovocytaire) (Bister, 1998).

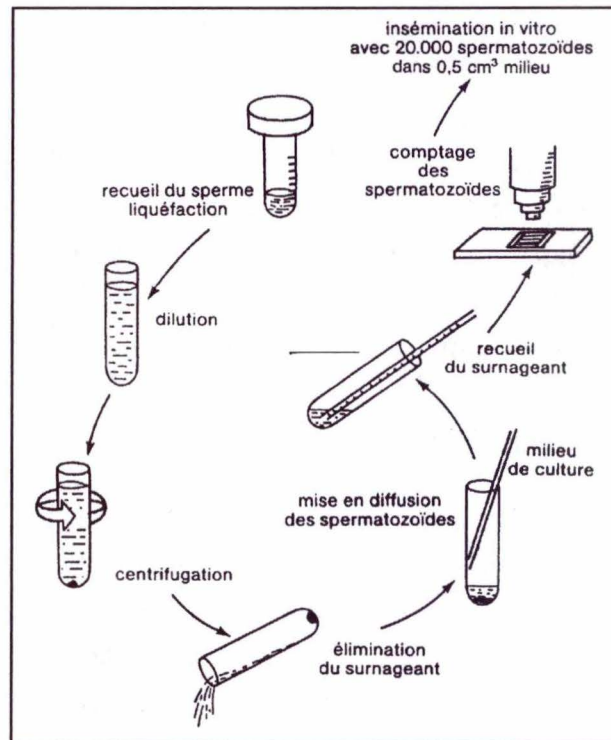
## **3. La capacitation des spermatozoïdes**

La première chose que l'on fait après la récolte du sperme est de l'analyser. On procède alors à un comptage du nombre de spermatozoïdes en cellule de type hématimétrique (Bürker, Thomas,...), ainsi qu'à une évaluation de leur motilité. Les plus féconds sont les fléchants, c'est-à-dire ceux qui se déplacent de façon rectiligne. On peut aussi évaluer la proportion de morts par une coloration à l'éosine/nigrosine qui ne colore que les morts car ces colorants vitaux sont rejetés par les vivants.

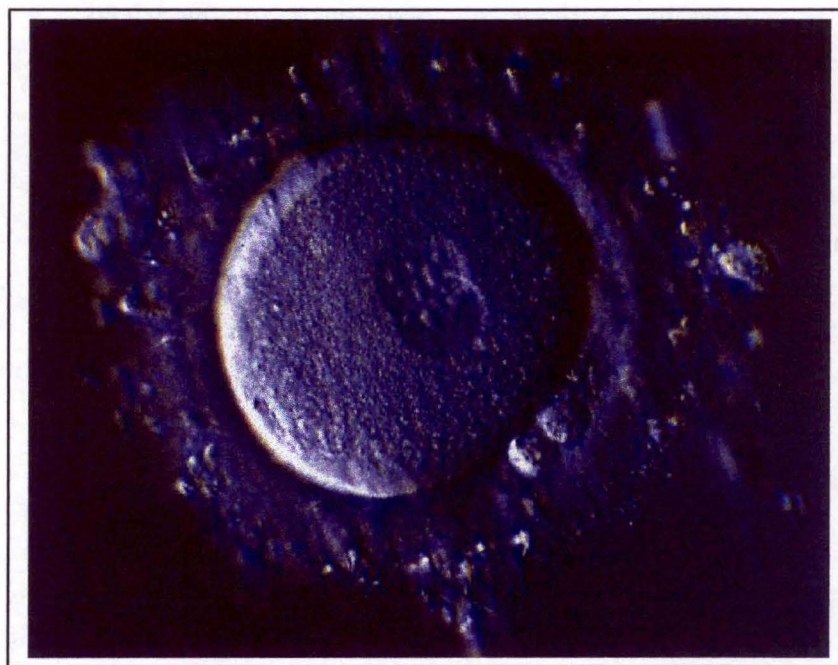
La capacitation des spermatozoïdes permet d'améliorer leur fécondité. Le milieu de capacitation contient un ensemble de sels minéraux, un tampon et des éléments nutritifs. La dilution du sperme constitue en elle-même le début de la capacitation car elle dilue des facteurs de décapacitation présents dans le plasma séminal. Le milieu peut aussi contenir de l'héparine, du calcium ou encore de la BSA (Albumine Sérique Bovine) qui sont des facteurs de capacitation. Ces facteurs ne sont pas constants pour les différentes espèces. Enfin, le pH du milieu de capacitation doit tourner autour de 7,3.

Pour sélectionner les spermatozoïdes vivants, on peut faire une centrifugation sur un gradient de percoll (90 et 45 %) à 2500 RPM pendant 20 minutes (*figure 27*). Les spermatozoïdes vivants, un peu plus denses, se retrouvent plutôt au fond tandis que les morts s'arrêtent à l'interface des deux concentrations de percoll.





*Figure 28* : Technique du swim-up ou migration ascendante pour séparer les spermatozoïdes morts des vivants (Testard, 1986).



*Figure 29* : zygote humain : on voit distinctement les deux pronuclei au centre du cytoplasme ainsi que les deux globules polaires en périphérie, sous la zone pellucide (Eurêka numéro spécial fécondation in vitro, 1999).

Une autre technique utilisée est celle du « swim-up » (*figure 28*). Elle consiste à centrifuger le sperme dilué de façon à obtenir un culot de spermatozoïdes. Le surnageant est alors éliminé et du milieu de capacitation est déposé délicatement sur le culot. Le tout est laissé à l'étuve pour une petite heure. Les spermatozoïdes vivants - les plus mobiles - arriveront à se dépêtrer du culot et migreront alors dans le surnageant. On peut ainsi les récupérer. Le problème de cette technique est la perte d'une bonne proportion de gamètes qui, situés plus profondément dans le culot, y restent coincés.

Il faut remarquer que cette capacitation ne doit pas durer trop longtemps sinon la réaction acrosomiale risque de commencer en l'absence des ovocytes, ce qui fait autant de spermatozoïdes perdus. Chez le bélier, elle dure 1 à 2 h pour du sperme congelé et de 2 à 4 h pour de la semence fraîche (Bister, 1998).

#### **4. La fécondation in vitro.**

Pour la fécondation, on rassemble dans un puits les ovocytes maturés et les spermatozoïdes capités. Les COC sont lavés plusieurs fois dans du milieu par des aspirations successives avec une pipette pasteur effilée, ce qui permet d'enlever la majorité des cellules de la corona radiata. On peut aussi ajouter de la trypsine ou de l'hyaluronidase (des protéases) qui facilitent l'opération.

Le milieu de fécondation est souvent proche du milieu de capacitation, de telle sorte que la capacitation peut se poursuivre jusqu'à la fécondation. Il est maintenu à pH 7,7 dans l'étuve à CO<sub>2</sub>.

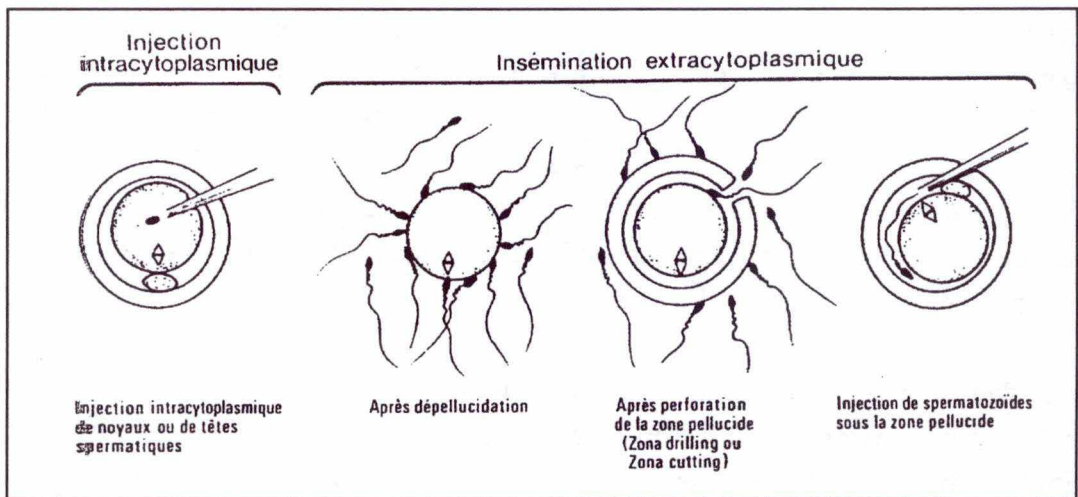
Les spermatozoïdes sont dilués jusqu'à une concentration de  $10^5$  par 100 µl. Les ovocytes sont mis dans un puits où l'on rajoute les spermatozoïdes. Après 24 h, on lave les zygotes et on les met dans un milieu de développement embryonnaire.

On peut fixer une partie des ovocytes pour évaluer le taux de fécondation par observation des deux pronucléi (*figure 29*). Cette fixation se fait dans un mélange de méthanol et d'acide acétique qui fixe la cellule et éclaircit son cytoplasme (Bister, 1998).

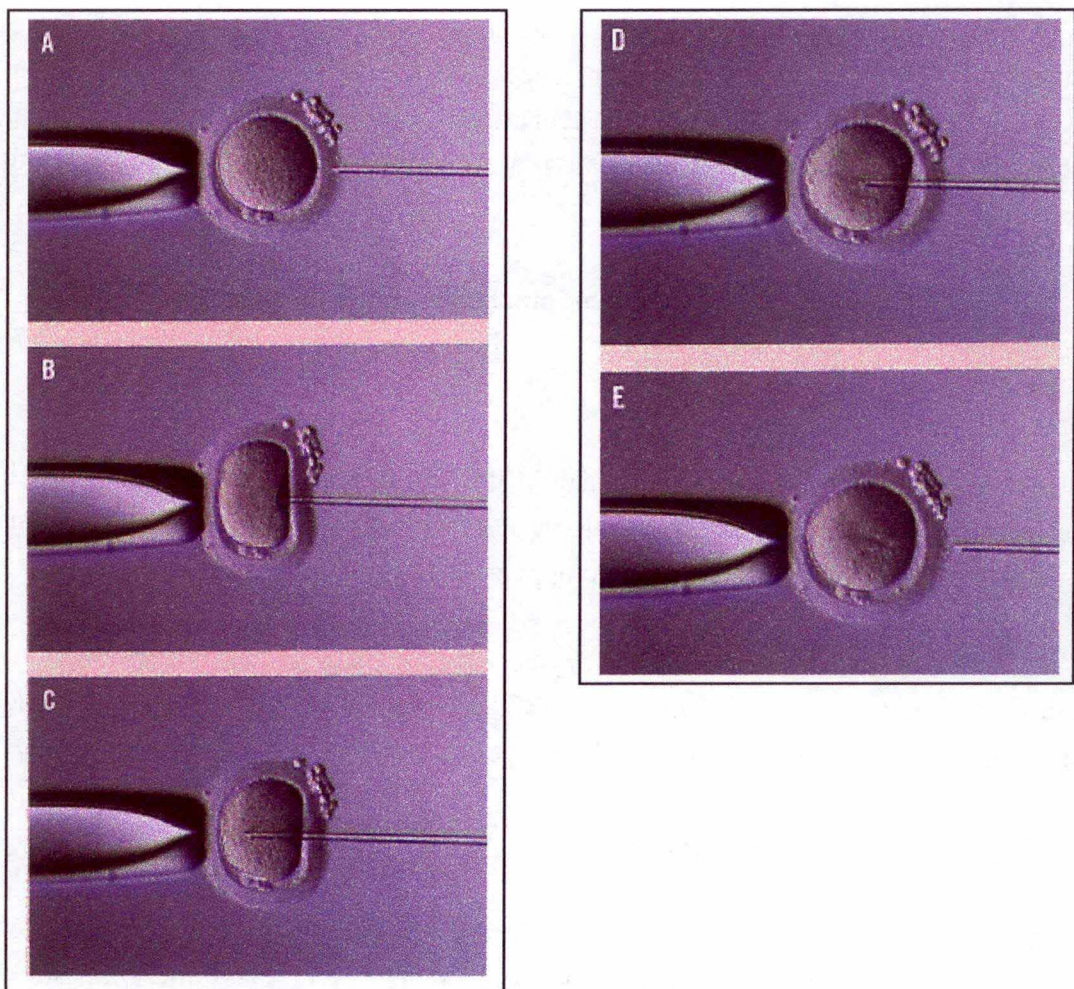
#### **5. La fécondation assistée.**

Lorsque c'est chez la femme que l'on a un problème, par exemple de type obstruction des trompes de fallope, on procède alors à une FIVETE classique. Mais si c'est un problème au niveau du sperme qui n'est pas assez abondant ou motile, on se tourne vers d'autres techniques. Si le problème rend impossible toute fécondation, on peut utiliser la banque de sperme de l'hôpital. Dans le cas contraire, où la déficience n'est pas trop grave, on peut avoir recourt aux techniques de fécondation assistée (*figure 30*).





*Figure 30* : Fécondation assistée (Testard, 1989).



*Figure 31* : Injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) :

- A et B : la pipette traverse la zone pellucide,
  - C : la pipette pénètre dans le cytoplasme,
  - D : injection du spermatozoïde,
  - E : l'ovocyte garde une empreinte dans le cytoplasme
- (Eurêka numéro spécial fécondation in vitro, 1999).



### 5.1. Dépellucidation totale.

La technique de dépellucidation totale de l'ovule reste limitée à des études expérimentales pour évaluer la fécondance des spermatozoïdes, en évaluant la capacité de ceux-ci à pénétrer un ovocyte de hamster. En effet, la zone pellucide semble nécessaire pour assurer la cohésion des blastomères, la protection de l'œuf au début du développement et probablement l'action des facteurs de croissance sécrétés par les blastomères (Testard et Lassalle, 1989).

### 5.2. Dépellucidation partielle

Le « zona drilling », ou perforation chimique de la zone pellucide, est réalisée à l'aide d'un milieu Tyrode acidifié, sous contrôle d'un équipement de micromanipulation. Ainsi, le spermatozoïde peut pénétrer via ces pores artificiels, et cette pénétration de l'ovocyte ne dépend plus d'une interaction spécifique entre la zone pellucide et le spermatozoïde (Testard et Lassalle, 1989).

Le « zona cutting », ou perforation mécanique de la zone pellucide, est la réalisation de pertuis dans la zone pellucide à l'aide d'une microaiguille. Le taux de fécondation est plus faible qu'avec le zona drilling, mais l'embryon est moins souvent endommagé (Testard et Lassalle, 1989).

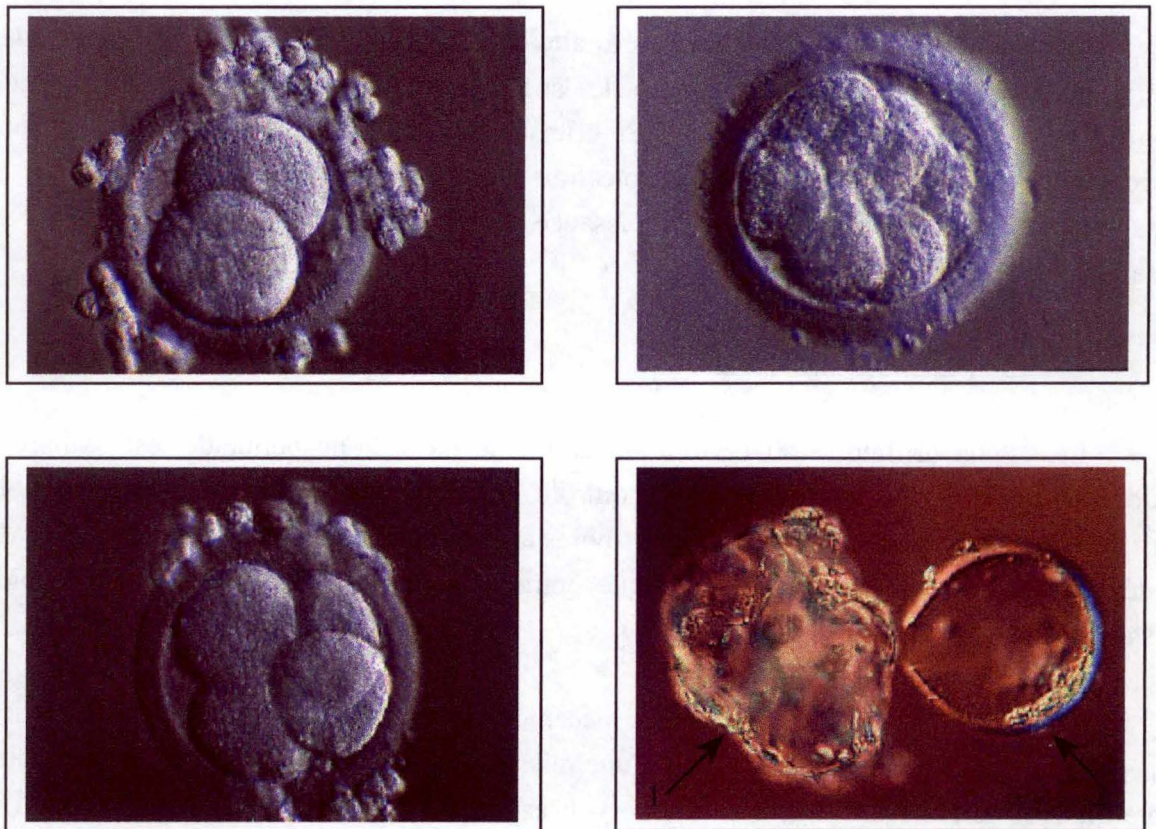
### 5.3. Injection intracytoplasmique du spermatozoïde.

L'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) comporte l'effraction de la zone pellucide et de la membrane plasmique et l'injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire (*figure 31*). L'avantage est que l'on sait réaliser une fécondation avec un seul spermatozoïde, voire même une tête ou un noyau de spermatozoïde. L'ovocyte déclenchera les processus de décondensation du noyau et de formation du pronucleus mâle (Testard et Lassalle, 1989).

### 5.4. Injection sous la zone pellucide du spermatozoïde.

Ici la zone pellucide n'est pas détruite mais seulement perforée et le cytoplasme ovocytaire est respecté, tout comme pour les techniques de zona drilling/cutting. Mais contrairement à ces techniques, on peut ici sélectionner les spermatozoïdes et n'en introduire qu'un nombre limité, le plus souvent trois dans l'espace périvitellin, entre la membrane plasmique et la zone pellucide. Le taux de polyspermie est proportionnel au nombre de spermatozoïdes injectés (Testard et Lassalle, 1989).





*Figure 32* : Divisions et développement de l'embryon :

A : stade 2 cellules,

B : stade 4 cellules,

C : stade 8 cellules,

D : sortie du blastocyste (1) hors de la zone pellucide (2)

(Eurêka numéro spécial fécondation in vitro, 1999).

## **6. Le développement embryonnaire.**

Comme pour la maturation in vitro, de nombreux milieux différents ont été mis au point pour permettre le développement embryonnaire car celui-ci reste limité si l'embryon ne rencontre pas les conditions optimales présentes dans l'oviducte. Chez l'homme, l'utérus accepte des embryons qui n'ont pas encore le développement qu'il devraient avoir dans des conditions naturelles. Par contre, chez les animaux, on ne transfère que des blastocystes, ou des embryons à des stades très proches.

Le milieu le plus connu qui permet un développement des premiers stades embryonnaires (*figure 32*) est le SOF (Fluide Oviducal Synthétique). Il ne permet cependant pas d'atteindre le stade blastula, qui nécessite une coculture avec des cellules de l'oviducte ; ces cellules synthétisent toute une série de facteurs de croissance nécessaires à l'embryon dont la nature est encore inconnue.

Le développement embryonnaire se fait dans un milieu le moins volumineux possible, pour que les différents facteurs sécrétés par les embryons soient suffisamment concentrés. C'est pourquoi il se fait dans des gouttelettes de quelques microlitres de SOF, et sous une couche d'huile minérale. Celle-ci empêche d'avoir une évaporation du milieu qui en modifierait l'osmolarité et l'acidité, et elle diminue la concentration en O<sub>2</sub> dissout, reconstituant ainsi des conditions proches de celles de l'utérus.

Les embryons sont enfin transférés dans un utérus ou congelés (Bister, 1998).

## **7. Le transfert d'embryons in utero.**

Le transfert d'embryons peut se faire à partir d'embryons obtenus naturellement, par insémination artificielle ou par FIVETE. Dans le cas du transfert d'un embryon venant d'une mère donneuse à une mère receveuse, une synchronisation des cycles ovulatoires de la donneuse et de la receveuse est nécessaire et obtenue par des traitements hormonaux. Les embryons sont récupérés par un lavage de l'utérus.

On transfère souvent plusieurs embryons, 2 ou 3, et même quelques uns en plus qui possèdent beaucoup de fragments cytoplasmiques et qui sont dans l'impossibilité de faire un développement entier. Ceci donne des concentrations plus élevées de trophoblastine (IFN $\tau$ ) qui est sécrétée par le trophoctoderme des embryons et favorise la nidation. Ce transfert peut s'effectuer par voie transcervicale ou par endoscopie (Bister, 1998).



**CHAPITRE IV :**  
**L'HORMONE ET LES FACTEURS DE**  
**CROISSANCE DANS LA FIVETE.**

**I. DANS LA MATURATION IN VITRO.**

Ce chapitre concerne ce qui fait réellement l'objet de mon mémoire : l'effet des facteurs de croissance sur la maturation ovocytaire in vitro (MIV). Un bon nombre d'études ont été menées sur le sujet. Voici toute une série de résultats qui en sont ressortis.

Les IGF possèdent des effets contradictoires suivant l'espèce considérée. Chez le lapin, l'IGF-I stimule le développement folliculaire, la production d'oestradiol et la maturation ovocytaire. Il agit via des récepteurs spécifiques situés sur la membrane ovarienne. Cela est valable pour les cultures folliculaires in vitro (Yoshimura et al., 1996). Chez le porc, le même facteur permet aux cellules du cumulus de se développer en réponse à un traitement à la FSH et il stimule la maturation nucléaire. C'est un composant du sérum bovin fœtal qui est utilisé lors des maturations in vitro (Singh et Armstrong, 1996 ; Balwant et Armstrong, 1997 ; Sirotkin et al., 1998). Chez le bovin, l'IGF-I n'a pas d'effet sur la MIV tandis que l'IGF-II la stimule.

L'EGF possède chez le bovin un effet stimulateur sur l'expansion du cumulus et sur la maturation méiotique. Cependant, Il n'y a pas d'effet additif entre l'EGF et le sérum de veau fœtal (FCS). Ceci semble indiquer que l'EGF est le principal facteur du FCS (Lorenzo et al., 1995 ; Lonergan et al., 1996). Chez le porc, il stimule la maturation nucléaire et cytoplasmique des ovocytes in vitro. Les effets de l'EGF sur la maturation ovocytaire sont influencés par les gonadotropines et autres substances présentes dans le fluide folliculaire (Uhm et al., 1998). Chez le lapin, différents résultats semblent indiquer qu'il existe des effets stéroïdiens dépendants de l'EGF sur la MIV. L'effet positif de l'EGF sur la MIV se retrouve aussi chez le chien (Russ et al., 1998).

Le bFGF et le TGF $\beta$ 1 sont essentiels chez les bovins pour la protéolyse extracellulaire au niveau de la matrice extracellulaire des COC. Il vont permettre par leur action la maturation extracytoplasmique avec l'expansion du cumulus (Bieser et al., 1998).

Le CSF-1, quant à lui, va induire un délai dans la maturation nucléaire chez le porc pour permettre une synchronisation avec la maturation cytoplasmique et augmenter ainsi les taux de fécondations ultérieurs (Tekpetey et al., 1996).

La GH accélère la maturation nucléaire chez le bovin. Elle augmente aussi l'expansion du cumulus. Elle induit la MIV et augmente donc les taux de métaphase II et le diamètre des COC, même si la FSH augmente encore plus ce diamètre (Izadyar et al., 1996a ; Izadyar et al., 1996b ; Perrad et al., 1998).

## **II. DANS LA FECONDATION IN VITRO.**

L'utilisation d'EGF dans le milieu de MIV augmente le taux d'ovocytes monospermiques après la fécondation in vitro chez les bovin (Im et Park, 1995). Par contre, chez le porc, l'EGF n'influence pas les taux de polyspermie et de pénétration des gamètes mâles.

L'ajout de CSF-1 dans le milieu de MIV permet une synchronisation des maturations nucléaire et cytoplasmique des ovocytes porcins, ce qui va en augmenter la fécondité (Tekpetey et al., 1996).

La GH augmente la proportion d'ovocytes fertilisés chez les bovins (Perrad, 1998).

## **III. DANS LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.**

L'IGF-II et l'insuline possèdent un effet stimulateur sur le développement embryonnaire et augmentent la formation de blastocystes chez les bovins (Izadyar et al., 1996). L'IGF-I additionné à forte concentration à du sérum de vache et des cellules de granulosa peut augmenter le développement des embryons bovins produits in vitro (Palma et al., 1997).

L'EGF quant à lui n'a pas d'effet positif sur le développement embryonnaire chez le bovin sauf pour les embryons cultivés seuls pour lesquels il va augmenter le taux de clivage lors du stade de huit cellules (Im et Park, 1995 ; Keefer et al., 1994 ; Rieger et al., 1998). Chez le porc, il a même tendance à diminuer le taux de formation de blastocystes.

Le TGF $\beta$ 1 ne semble pas affecter le développement des blastocystes, le taux de clivage ou encore le nombre de cellules chez les bovins (Keefer et al., 1994). Le PDGF stimule le développement embryonnaire in vitro chez le lapin. Le TGF, le FGF et le PDGF augmentent chez les bovins le passage de l'embryon du stade morula au stade blastula (Lim et al., 1996).

La GH augmente la fréquence des clivages du zygote et le taux de blastocystes chez le bovin (Perrad, 1998). Elle possède ainsi un effet positif sur le développement si on l'a mise



---

dans le milieu de MIV : elle est importante pour l'acquisition par l'ovocyte de la compétence à poursuivre un développement embryonnaire ultérieur (Perrad, 1998).

# DEUXIEME PARTIE :

## MATERIEL ET METHODES



Les expériences réalisées pour ce mémoire ont été effectuées au laboratoire de Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.

Le sperme utilisé provient du Centre d'insémination et de sélection ovine (CISO) de Faulx-Les-Tombes ; quant aux ovocytes, ils ont été prélevés sur des brebis tuées à l'abattoir d'Anderlecht.

## **I. MATURATION IN VITRO.**

### **1. Synthèse des différents milieux.**

Les produits ayant servi pour les essais de maturation in vitro et les quantités utilisées dans le milieu de récolte et de lavage (tableau 2) et dans le milieu de maturation (tableau 3) sont donnés dans les tableaux 1 à 3.

*Tableau 1* : Liste des produits utilisés et de leurs références.

Nom du produit	Référence
bFGF humain recombinant	Biosource PHG0024 (USA)
Chlorure de sodium (NaCl)	Vel 1723
EGF humain recombinant	Biosource PHG0064 (USA)
Fluide folliculaire	Ovaires abattoir
FSH ovine (o-FSH)	NIH NIAmDD-oFSH-RP-1
Gentamycine	Sigma G-1272
Héparine	Leo
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2ethanesulfonic acid])	Sigma H-6147
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck 4936
IGF-I humain recombinant	Biosource PHG0074 (USA)
IGF-II humain recombinant	Biosource PHG0084 (USA)
Milieu de culture tissulaire 199 (TCM 199)	Gibco 31100-076

*Tableau 2* : Composition du milieu de récolte.

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
Milieu de culture tissulaire 199 (TCM 199)	9,820 g
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	2,200 g
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2ethanesulfonic acid])	2,283 g

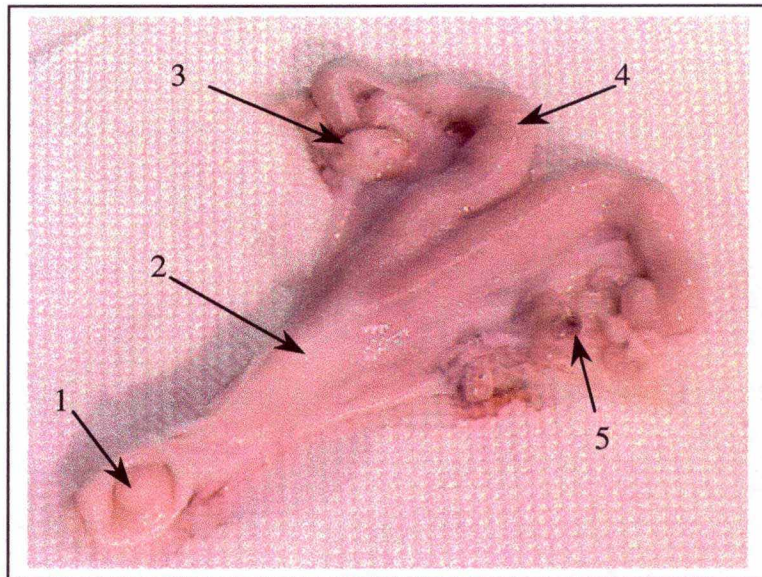


Figure 1 : Tractus génital de brebis :

- 1 : col de l'utérus,
- 2 : utérus,
- 3 : ovaire,
- 4 : corne utérine,
- 5 : corps jaune.

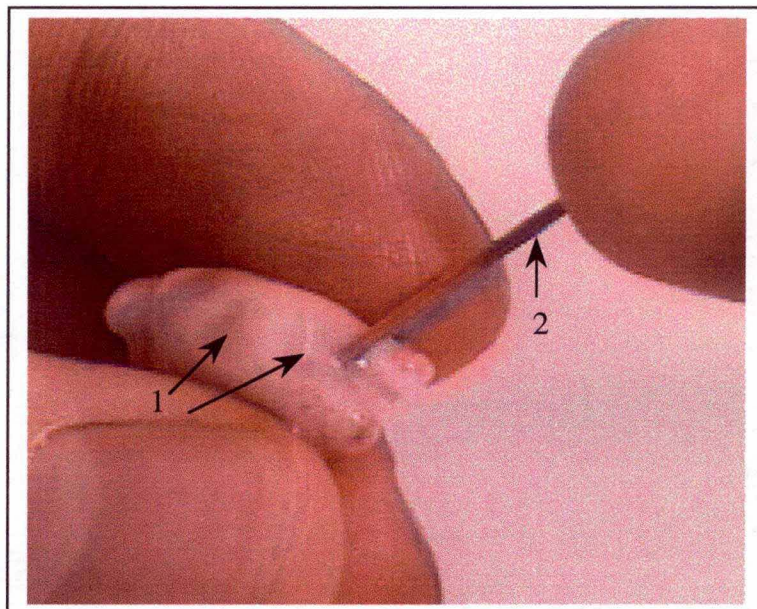


Figure 2 : Ponction d'un follicule :

- 1 : follicules,
- 2 : aiguille de ponction.



Gentamycine (10 %)	4 ml
Héparine (5000 UI/ml)	2 ml

Le milieu de lavage est identique mais il ne contient pas d'héparine.

*Tableau 3* : Composition du milieu de maturation.

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
Milieu de culture tissulaire 199 (TCM 199)	9,820 g
Hydrogénocarbonate de sodium	2,200 g
o-FSH	5 µg
Fluide folliculaire	10 %

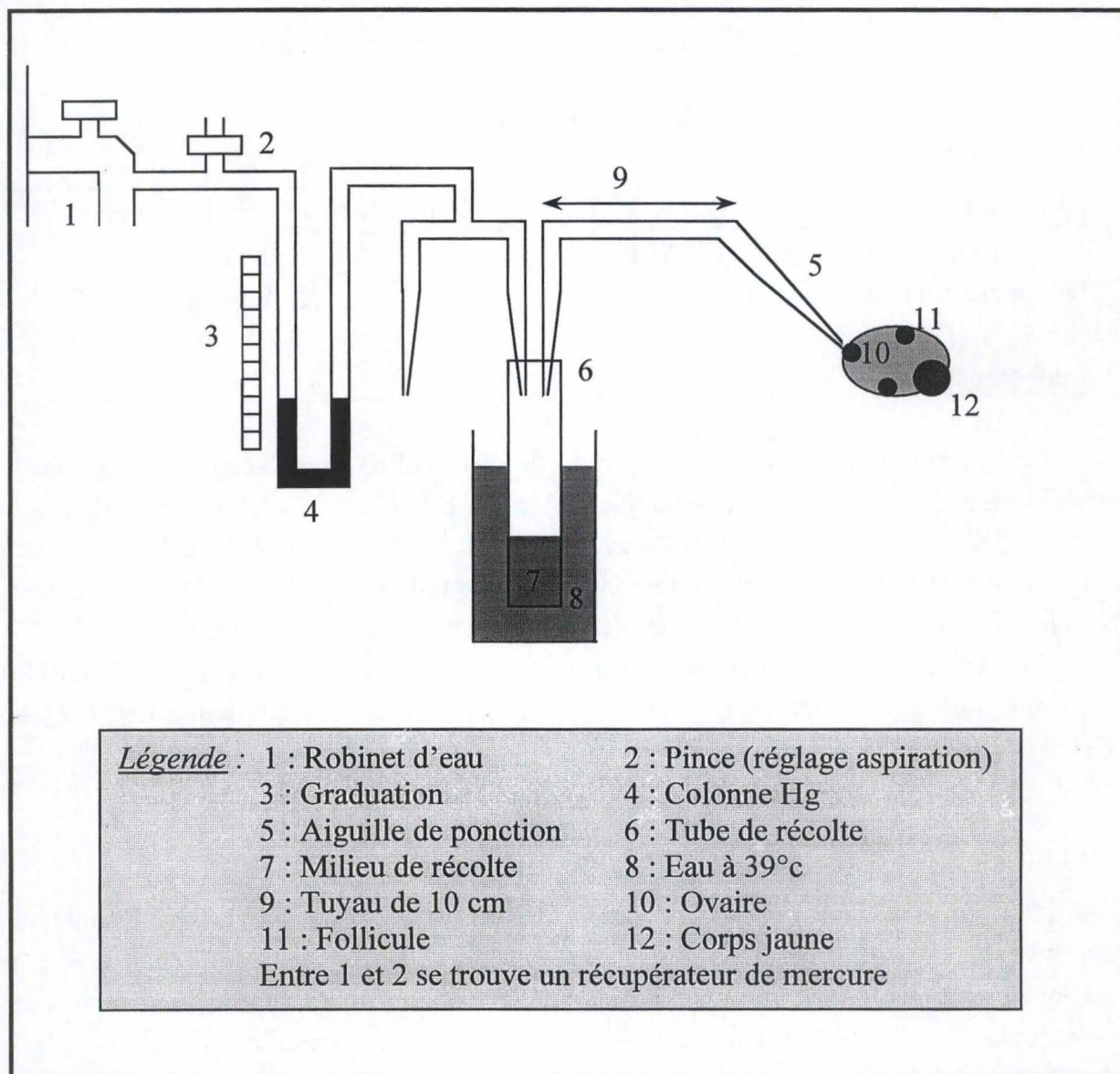
Ces trois milieux sont préparés avec de l'eau milliQ (aimablement fournie par le laboratoire de Biologie Moléculaire Structurale) et leur pH est ajusté à 7.3. Ils sont préparés la veille de leur utilisation et mis dans l'étuve à CO<sub>2</sub> (39 °C, 95 % H.R. et 5 % de CO<sub>2</sub>) (Heto Lab Equipment Cellhouse 200) pour permettre une équilibration entre le CO<sub>2</sub> dissous (sous forme d'hydrogénocarbonate) et le CO<sub>2</sub> de l'air. Cet équilibre, avec le taux constant de CO<sub>2</sub> dans l'air, va permettre de tamponner le milieu et de le maintenir à un pH constant. Toutes les solutions utilisées sont filtrées avec des filtres millipores des 0.22 µ (Syringe filters 0.2 µm, Gelman Sciences 3316) pour les rendre stériles.

**2. Récolte des ovocytes.**

Les ovaires sont prélevés a l'abattoir d'Anderlecht sur des brebis dans les minutes qui suivent leur sacrifice (*figure 1* (1)). Ils sont directement placés dans un récipient contenant du liquide physiologique (NaCl à 9 g par litre d'eau distillée) à 39°C. Ce même récipient est contenu dans une boîte en frigolite avec de l'eau à 39°C, afin d'amplifier l'inertie thermique de l'ensemble. Cette eau est d'ailleurs régulièrement remplacée pour ainsi maintenir la température de 39°C la plus constante possible. Une fois un quota de 80 à 100 ovaires atteint, ceux-ci sont ramenés endéans l'heure à Namur.

Les ovaires sont alors lavés deux fois dans du liquide physiologique à 39°C et sont gardés au chaud dans la même solution, au bain-marie à 39°C. Les follicules de 2 à 10 mm de diamètre sont ensuite ponctionnés (*figure 2*) grâce à la pompe à vide schématisée à la *Figure 3*. L'aiguille de ponction de 18G1/2 (Seringe 18G1/2, Terumo 40-12) est introduite dans le follicule et est manipulée de façon à « racler » le follicule. L'aspiration utilisée est d'environ 25-30 mm Hg. On aspire ainsi tout le contenu du follicule, c'est-à-dire le fluide folliculaire et le COC (Complexe Ovocyte-Cumulus) passent par un tuyau d'une dizaine de centimètres pour se retrouver dans un tube en verre (Venoject Terumo) contenant du milieu de récolte.

(1) Toutes les photos ont été tirées d'un film réalisé par le centre audio-visuel des FUNDP lors de nos



*Figure 3* : Système de ponction des follicules.



Après la ponction de 5-6 ovaires, la tuyauterie est rincée par aspiration d'une petite quantité de milieu de récolte, ce qui permet de ramasser les COC qui ont tendance à coller dans le tuyau suite à la formation de fibrine. En général, on obtient ainsi pour les 80 ovaires deux tubes de 10 ml remplis d'un mélange de fluide folliculaire et de milieu de récolte.

### **3. Traitement et mise en maturation des ovocytes.**

#### **3.1. Milieux de maturation.**

A partir du milieu de maturation de base, on peut tester l'effet des facteurs de croissance. En effet, on sait que le fluide folliculaire rajouté dans le milieu de maturation est surtout utilisé pour sa richesse en facteurs de croissance. Seulement, l'utilisation d'un milieu non défini implique des variations dans sa composition, et aussi des problèmes de stérilité ou de présence d'une substance inadéquate. Il serait donc intéressant de mettre au point un milieu défini pouvant remplacer le fluide folliculaire, d'où l'étude de l'effet des facteurs de croissance.

Un essai pour un facteur de croissance va donc comprendre un test négatif, un test positif, un test avec le facteur de croissance, et enfin un même test avec en plus du fluide folliculaire. Le test négatif est un essai de maturation ovocytaire avec du milieu de maturation classique mais sans fluide folliculaire, contrairement au test positif qui en contient. Le test du facteur de croissance est mené avec du milieu de maturation classique sans fluide folliculaire mais additionné du facteur de croissance en question à une concentration de 10 ng par ml en général. Ceci va permettre de voir si le facteur de croissance est capable de remplacer le fluide folliculaire. Pour vérifier si ce facteur est présent dans le fluide folliculaire ou non, on effectue un quatrième test avec le facteur de croissance et le fluide folliculaire. Si l'effet reste inchangé par rapport à celui du facteur de croissance seul, on dira qu'il n'y a pas d'effet additif entre le fluide folliculaire et le facteur de croissance, ce qui est une indication de la présence probable du facteur de croissance ou d'une molécule très proche dans le fluide folliculaire.

Lorsqu'on teste plusieurs facteurs de croissance, un test positif et un test négatif suffisent pour l'ensemble des tests. Pour une meilleure comparaison des résultats, il vaut mieux utiliser toujours les mêmes produits, et en particulier pour le fluide folliculaire (qui provient d'un même pool d'ovaires). De même, on utilisera toujours des volumes identiques de milieu de maturation par puits (plaques à quatre puits), avec un nombre identique d'ovocytes par puits.

#### **3.2. Traitement des ovocytes et mise en maturation.**

Les tubes de récolte sont gardés au chaud dans le bain marie à 39°C. Ils vont être vidés dans des boîtes de pétri quadrillées de 9 cm de diamètre (*figure 4*). Cette opération et

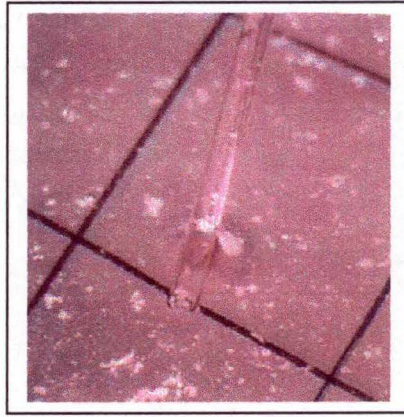


Figure 4 : Récupération des COC à l'aide de l'unopette.



Figure 5 : Lavage des COC récupérés.



Figure 6 : COC avant la maturation.



celles qui suivent sont effectués sur une plaque chauffante maintenue à 39 °C et mise sous la hotte à flux laminaire (hotte à flux horizontal Holten LaminAir) pour garantir la stérilité. Le binoculaire placé sous la hotte est aussi muni d'une plaque chauffante. Les différentes manipulations des ovocytes sont effectuées sous la hotte dans des conditions de stérilité maximum, toujours à 39°C, et avec une seringue hamilton de 10 µl munie d'une unopette (capillaire en verre) préalablement autoclavée.

Les COC sont ainsi récupérés (*figure 4*), déposés dans le milieu de lavage et transférés successivement dans quatre puits de lavage (contenant 500 µl de milieu de lavage par puits) pour les isoler des amas cellulaires et autres débris qui se trouvent dans le milieu de récolte (*figure 5*). Ceci va également permettre d'éliminer un maximum de contaminations et de tuer les bactéries grâce à la présence de gentamycine dans le milieu.

Enfin, les COC avec un cumulus constitué d'au moins deux couches de cellules mais sans masse granulosale importante (*figure 6*) sont mis dans les puits avec les milieux de maturation (333 µl de milieu par puits). Sauf pour les essais initiaux de mise au point, nous avons chaque fois mis 6 ovocytes par puits. Les boîtes de pétri sont alors placées pour 24 heures dans l'étuve à CO<sub>2</sub>. Celle-ci est chauffée à 39 °C, avec une humidité relative d'environ 95 % et un pourcentage de CO<sub>2</sub> de 5 %. Il a en effet été montré que l'atmosphère optimum pour la MIV et la FIV possède 95 % d'humidité relative et 5 % de CO<sub>2</sub> (104).

## **II. RECOLTE ET CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES.**

### **1. Synthèse des différents milieux.**

Les tableaux 4 à 7 donnent la liste des produits utilisés (tableau 4), la composition du dilueur de sperme de bouc et de bélier (tableau 5), de la solution saline (tableau 6) et du milieu de capacitation DM-H (tableau 7).

Tableau 4 : Liste des produits utilisés pour la dilution et la capacitation du sperme.

Nom du produit	Référence
Acide ascorbique	Vel 4074
Albumine bovine sérique (BSA)	Sigma A-9647
Carbonate de Calcium	Vel 1223
Chlorure de calcium bihydraté (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Vel 1226
Chlorure de magnésium 6 fois hydraté (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	Merck 5833
Chlorure de potassium (KCl)	Merck 4936

Chlorure de sodium (NaCl)	Vel 1723
Dextrose anhydre (glucose)	Vel 5974
	Vel 1290
Dihydrogénophosphate de sodium bihydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Vel 1769
Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	Merck 6346
Gentamycine	Sigma G-1272
Hyaluronidase	Sigma H-3506
HEPES	Sigma H-6147
Hydrogénocarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	Merck 6329
Inositol	Vel 7809
Lactate de calcium pentahydraté	UCB 551
Lévulose	Vel 1427
Monohydrogénophosphate de magnésium trihydraté ( $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma M-1265
Monohydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaHPO}_4$ )	Vel 1770
Pyruvate de sodium	Sigma P-4562
Rouge phénol	Sigma P-0290
Sérum de brebis en chaleur	Brebis en chaleur CRO
d- $\alpha$ -tocopherol	Sigma T-3634

*Tableau 5*: Composition du dilueur de sperme (DBB).

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
Acide ascorbique	0.050 g
Carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ )	0.070 g
Dihydrogénophosphate de sodium bihydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.650 g
Gentamycine	2 ml
HEPES	11.900 g
Inositol	11.200 g
Monohydrogénophosphate de magnésium trihydraté ( $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	0.140 g
Monohydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaHPO}_4$ )	6.500 g
Lévulose	11.200 g
Rouge phénol	2 ml
d- $\alpha$ -tocopherol	5 $\mu\text{l}$

La composition de ce dilueur a été établie par le laboratoire de physiologie animale.



Si l'on veut congeler le sperme, il faut rajouter dans le DBB 20 % de jaune d'œuf et 10 % de glycérol comme cryoprotecteurs.

Tableau 6 : Composition de la solution saline.

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
Chlorure de calcium bihydraté ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.330 g
Chlorure de magnésium 6 fois hydraté ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.106 g
Chlorure de potassium (KCl)	0.300 g
Chlorure de sodium (NaCl)	7.570 g
Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0.113 g
Hydrogénocarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0.350 g

Les différents sels sont dissous dans de l'eau milliQ. Cette solution saline peut se conserver un mois à 4°C. Elle est utilisée pour la préparation du milieu de capacitation DM-H.

Tableau 7 : Composition du milieu de capacitation.

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
Albumine bovine sérique (BSA)	4.000 g
Dextrose anhydre (glucose)	2.500 g
HEPES	2.383 g
Pyruvate de sodium	0.137 g
Sérum de brebis en chaleur	20 %

Les différents composants sont dissous dans de la solution saline. Le sérum de brebis en chaleur est auparavant décomplémenté durant 1 heure à 56 °C et filtré pour éliminer toute une série de protéines (les peptides comme les facteurs de croissance sont suffisamment résistants pour passer cette étape). La solution est ajustée à pH 7.3.

## 2. Récolte du sperme.

Le sperme est récolté au CISO de Faulx-les-Tombes. On utilise la technique de vagin artificiel en veillant à tout moment à ne donner aucun choc, thermique ou osmotique, aux spermatozoïdes. La qualité de la semence est ensuite évaluée : volume, numération des spermatozoïdes (spectrophotomètre à 500 nm ou sur cellule de Burkner), proportion de morts, motilité,... La semence est alors diluée avec du DBB jusqu'à une concentration de

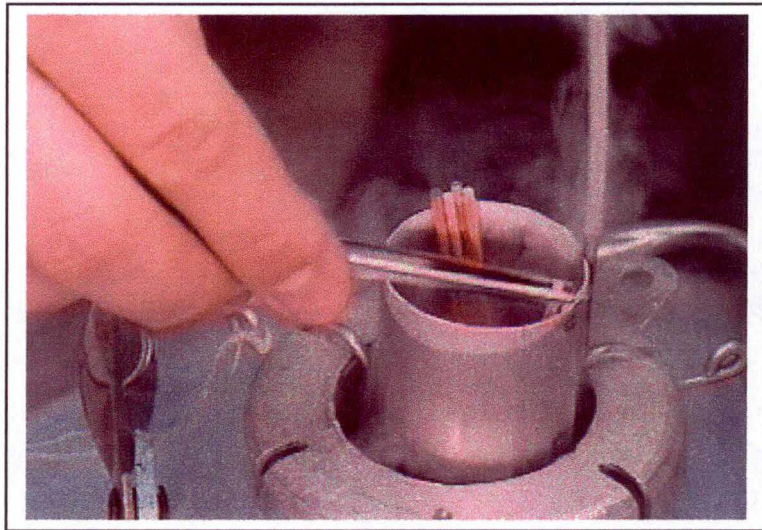


Figure 7 : Sortie de la paillette de l'azote liquide.

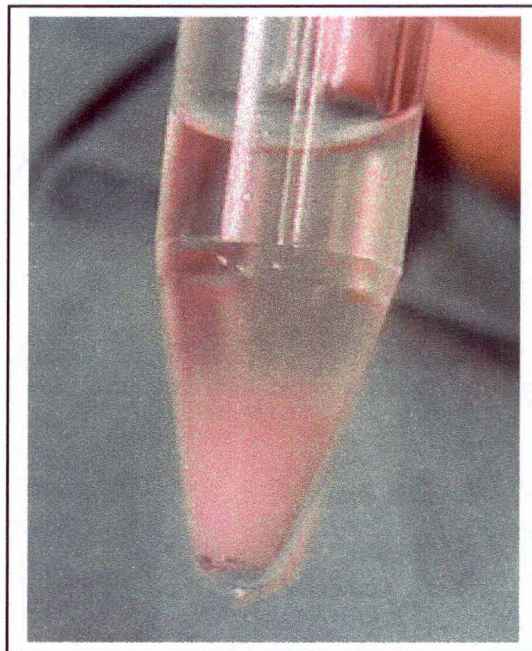


Figure 8 : Sperme dilué centrifugé.



spermatozoïdes de 400 millions par ml. Elle peut-être conservée au frigo à 4°C plusieurs jours, mais dans nos essais nous l'avons utilisée directement sans refroidissement à une température inférieure à 20°C.

Si l'on congèle le sperme, le DBB est additionné de jaune d'œuf (contenant des phospholipides) et de glycérol. Ces molécules de haut poids moléculaire vont provoquer une déshydratation des cellules et ainsi empêcher la formation de grands cristaux de glace. On fait ensuite les mêmes dilutions et la semence est mise dans des paillettes à raison de 250 µl, soit 100 millions de spermatozoïdes, par paillette. Après différentes étapes de refroidissement, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196°C.

### **3. Traitement et capacitation des spermatozoïdes.**

Si l'on utilise du sperme congelé (*figure 7*), la décongélation s'effectue en plongeant la paillette de sperme dans un bain marie à 39°C pendant une minute. La capacitation dure alors environ une heure. Pour le sperme frais, cette capacitation dure entre 4 et 6 heures. Différentes techniques de capacitation peuvent être utilisées. Pour le sperme congelé, étant donné que l'on a une proportion de spermatozoïdes morts d'environ 50 %, il est intéressant de séparer les cellules mortes des vivantes. Ceci peut-être réalisé via une centrifugation (Beckman Model J-6 Centrifuge) sur gradient de percoll ou un swim-up. Pour le sperme frais avec ses 95 à 100 % de spermatozoïdes vivants, il suffit de séparer les spermatozoïdes du dilueur et du liquide séminal qui contient des facteurs de décapacitation pour permettre une capacitation. On procède donc à une ou plusieurs centrifugations pour laver les spermatozoïdes.

#### **3.1. Centrifugation sur gradient de percoll.**

Cette méthode permet une sélection des spermatozoïdes vivants sur base de la densité. Elle est basée sur une différence (inexpliquée) de densité entre les spermatozoïdes vivants et les morts. On fait donc un gradient à deux niveaux de percoll dilué dans du milieu de capacitation. On place d'abord du percoll à 45 % dans un tube conique, et ensuite, à l'aide d'une pipette Pasteur, on met le percoll à 90 % sous celui à 45 %. Pour mieux visualiser le gradient, on peut rajouter une goutte de rouge phénol dans le percoll à 45 %. Après avoir déposé la semence au-dessus du gradient, on centrifuge 20 minutes à 2000 RPM. Les spermatozoïdes vivants, plus denses que les morts, se situent en majorité dans le culot tandis que les morts restent à l'interface des deux solutions de percoll. Le dilueur, quant à lui, reste en surface. Les spermatozoïdes vivants sont récupérés, centrifugés 20 minutes à 2500 RPM et le culot est resuspendu dans le milieu de capacitation. Après environ une heure, les spermatozoïdes sont capités (leur motilité a très fort augmenté).

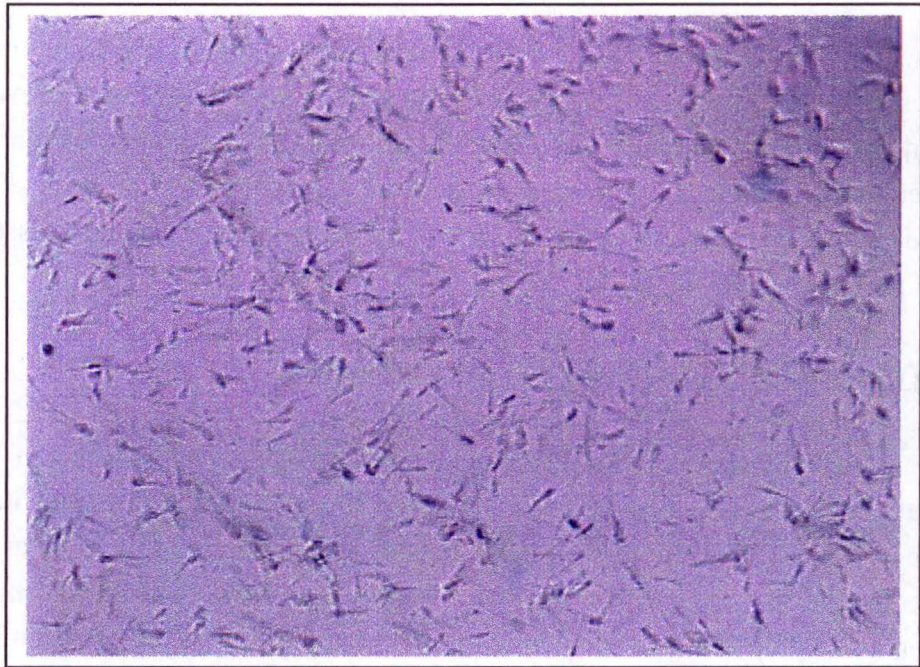


Figure 9 : Sperme dilué.



### 3.2. Swim-up.

La technique de swim-up permet une sélection des spermatozoïdes en fonction de leur motilité. On procède donc à une centrifugation de la semence additionnée de milieu de capacitation (5 minutes à 1000 RPM) (*figure 8*) et après avoir enlevé le surnageant, on rajoute délicatement du milieu de capacitation sur le culot sans le resuspendre. Les gamètes les plus mobiles vont remonter dans celui-ci et se capaciter. On pourra ensuite récupérer le surnageant et l'utiliser pour les fécondation (*figure 9*). On peut éventuellement reconcentrer les spermatozoïdes par une petite centrifugation (5 minutes à 1000 RPM) et une resuspension du culot dans un plus petit volume.

Ces deux techniques (gradient de percoll et swim-up) peuvent être additionnées d'un ou deux lavages avec du milieu de capacitation et de la gentamycine (4 ml par litre). On fait une dilution avec cette solution, suivie d'une centrifugation (5 minutes à 1000 RPM) et d'une resuspension du culot. Ceci permet de stériliser le plus possible le milieu contenant les spermatozoïdes.

### 3.3. Centrifugations de lavage du sperme frais.

Le sperme frais ne contenant pratiquement que des spermatozoïdes vivants, les techniques précédentes deviennent inutiles pour la capacitation. La seule chose à faire est de séparer les gamètes du dilueur qui contient des cryoprotecteurs qui sont en général assez toxiques, ainsi que du liquide séminal qui contient des facteurs de décapacitation. On procède donc à une dilution avec du milieu de capacitation éventuellement additionné de gentamycine (4ml par litre) suivie d'une centrifugation (5 minutes à 2000 RPM) qui est plus importante que pour du sperme congelé. En effet, dans le sperme frais, les spermatozoïdes ne sont pas déshydratés et donc sont moins denses et sédimentent moins vite. On enlève alors le surnageant pour enfin resuspendre le culot dans du milieu de capacitation. On peut faire plusieurs lavages du même type, tout en sachant que trop de centrifugations risquent d'altérer la viabilité des spermatozoïdes.

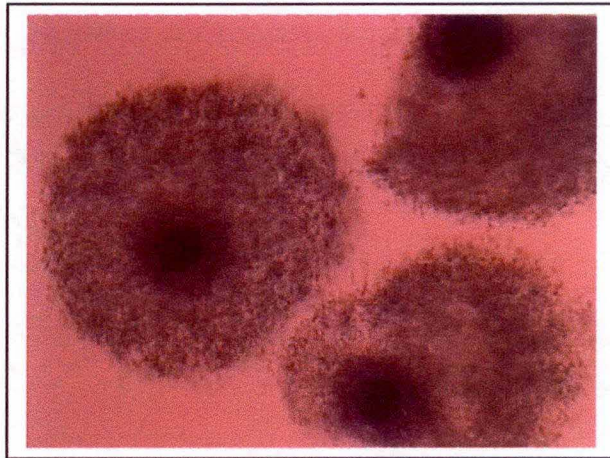


Figure 10 : COC maturés (cumulus expansé).

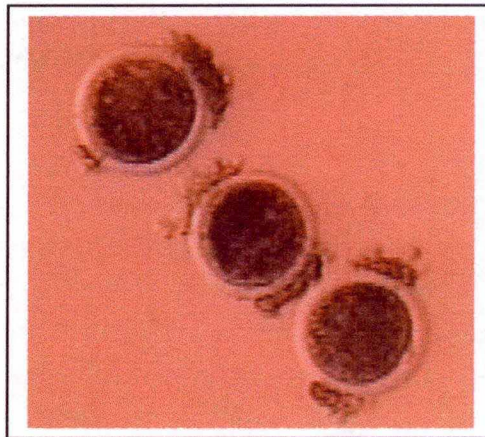


Figure 11 : COC maturés débarrassés de leur cumulus.

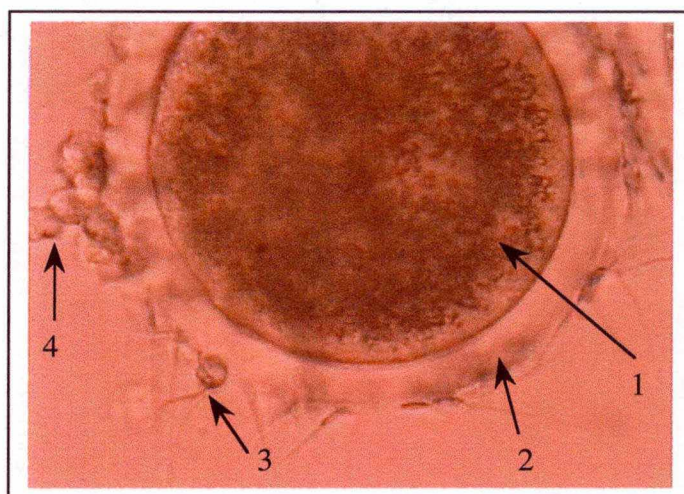


Figure 12 : 1 : cytoplasme,  
2 : zone pellucide,  
3 : spermatozoïde,  
4 : cellule du cumulus.



### **III. FECONDATION IN VITRO.**

#### **1. Synthèse des différents milieux.**

Voici la composition du milieu de fécondation (tableau 8).

Tableau 8 : Composition du milieu de fécondation.

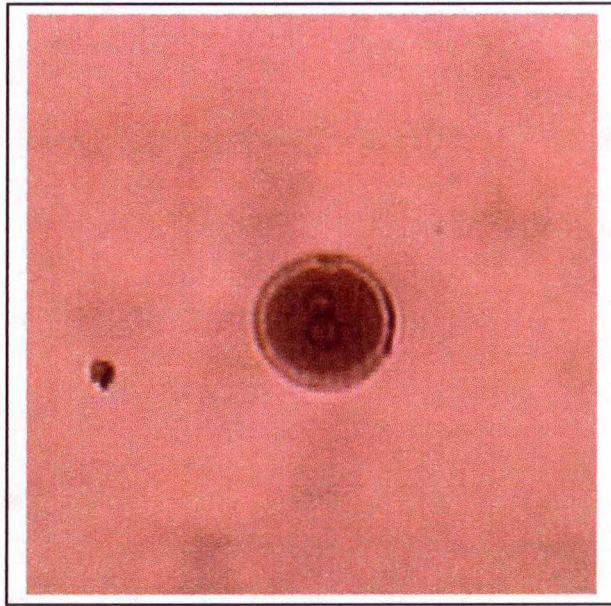
Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
DM-H	1 L
Lactate de calcium	1.800 g

Le pH de la solution est ajusté à 7.7. Cette solution sera disposée dans des puits pour le lavage (500 µl) et la fécondation (900 µl) des COC maturés. On prépare aussi un solution d'hyaluronidase pour débarrasser plus facilement les COC de leur cumulus. Cette solution contient 100 unités d'hyaluronidase par ml de milieu de fécondation.

#### **2. Traitement des COC et fécondation.**

Après 24 heures de traitement, la maturation des COC doit être réalisée (*figure 10*). Ceci est observable grâce à l'expansion du cumulus, signe de la maturation extraovocytaire. L'expulsion du premier globule polaire est rarement observée, celui-ci ayant une existence très fugace. Les ovocytes expansés sont alors débarrassés de leur cumulus par un bref passage d'une minute dans l'hyaluronidase (qui coupe les protéines permettant l'adhérence des cellules du cumulus entre elles). On utilise une pipette Pasteur effilée jusqu'au diamètre de l'ovocyte pour faciliter cette manipulation (une ou deux aspirations suffisent pour enlever le cumulus). Les ovocytes sont lavés plusieurs fois dans du milieu de fécondation avant d'être mis dans les puits de fécondation (*figure 11*).

Les spermatozoïdes, après la capacitation, sont comptés sur cellule de Burkner et dilués jusqu'à une concentration de 10 millions par ml. Cent µl de semence capacitée sont alors additionnés aux ovocytes dans le milieu de fécondation (*figure 12*). Le tout est laissé 17 à 18 h dans l'étuve à CO<sub>2</sub> après quoi les ovocytes (éventuellement devenus des œufs) sont mis en développement embryonnaire ou sont fixés pour l'observation des pronuclei.



*Figure 13* : Ovocyte fécondé : on voit distinctement les deux pronuclei.



#### **IV. OBSERVATION DES GAMETES.**

##### **1. Liste des produits utilisés.**

La liste des produits utilisés est donnée au tableau 9.

Tableau 9 :Liste des produits utilisés et de leurs références.

Nom du produit	Origine, firme et numéro de référence
Acide acétique (99-100 %)	Vel 1005
Chlorure de sodium (NaCl)	Vel 1723
Citrate trisodique	CARLO ERBA 368057
Ethanol absolu	Vel 1115
Fluorochrome de Hoechst 33342 (bisbenzimidazole)	

##### **2. Méthodes d'observation.**

###### **2.1. Sans coloration.**

Les zygotes peuvent être facilement observés après une fixation dans une solution d'éthanol-acide acétique (3 : 1). On procède auparavant à 2 ou 3 lavages dans une solution de NaCl 9 ‰ pour les débarrasser des spermatozoïdes et des cellules du cumulus qui restent accrochées. Ces lavages permettent aussi d'éliminer les protéines présentes dans le milieu de fécondation et qui précipiteraient au contact de l'éthanol.

On peut alors observer les zygotes au microscope ou au binoculaire : le cytoplasme étant dégraissé, on peut distinguer les ovocytes non fécondés (où l'on voit encore la plaque métaphasique), les œufs fécondés (avec deux pronuclei ; *figure 13*) et les œufs polyspermiqes (avec plus de deux pronuclei). Cette technique convient aussi pour faciliter l'observation des ovocytes et des embryons (qui sont de toutes façons directement observables).

Les spermatozoïdes peuvent être observés en mettant une goutte de la solution (milieu de capacitation plus sperme) entre lame et lamelle chauffées (si on veut pouvoir estimer la motilité) ou sur cellule de Burkner (pour effectuer un comptage). Pour observer plus en détail la morphologie des gamètes et pouvoir distinguer par exemple les anormaux, ou encore ceux qui ont fait la réaction acrosomiale, on a recours au frottis. Celui-ci peut être accompagné d'une coloration à l'éosine-nigrosine : ces colorants vitaux vont se fixer dans les cellules mortes tandis que les vivantes les rejettent.

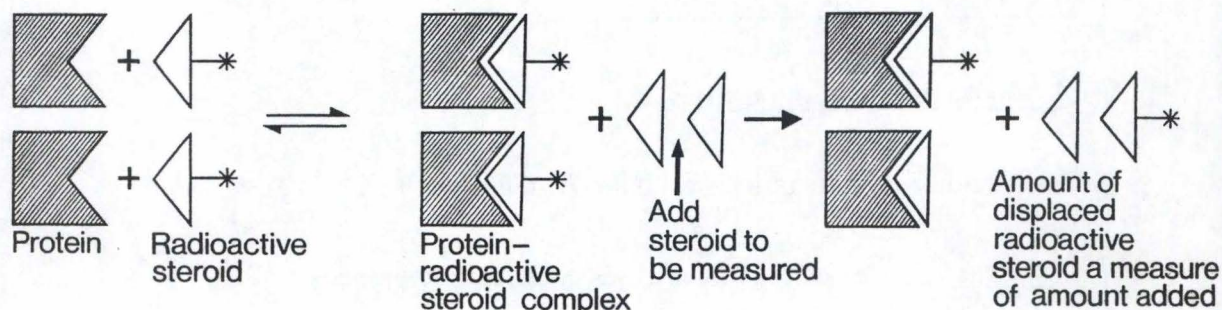


Figure 14 : Principe de la RIA : compétition pour la liaison à une protéine (dans notre cas, un anticorps anti-œstradiol) entre un stéroïde (pour nous, l'œstradiol) marqué et un non-marqué (in : Hormones in reproduction, 1972).

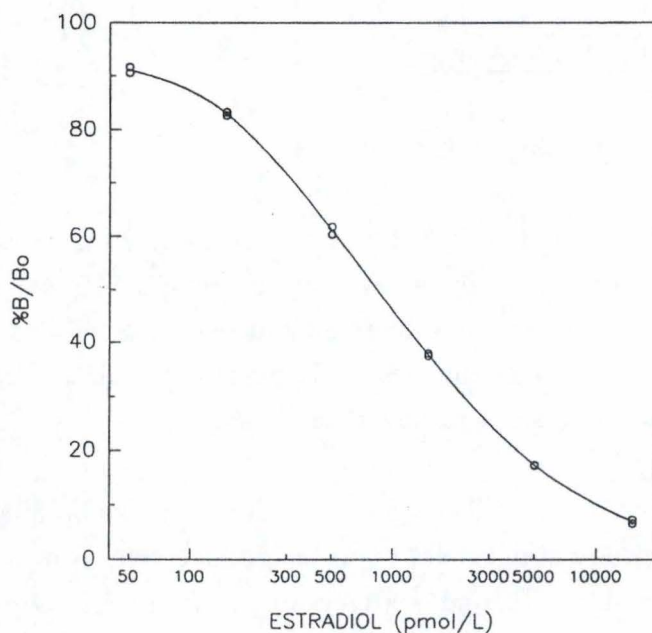


Figure 15 : Courbe d'étalonnage : %A/Ao en fonction de la concentration en œstradiol (échelle semi-logarithmique).



## 2.2. Avec une coloration au fluorochrome de Hoechst.

Le fluorochrome de Hoechst 33342 a la propriété de se fixer sur les chromosomes des ovocytes. Après les avoir laissé sécher sur une lame de microscope, on les plonge pour 24 heures dans une solution d'éthanol à 70 %. On prépare ensuite une solution de citrate trisodique dans laquelle on a rajouté 1 % de solution de Hoechst à 1 mg par ml d'eau. La lame est sortie de l'alcool, séchée et additionnée de 10 µl de la solution de travail pour alors la recouvrir avec une lame couvre-objet (on peut la sceller avec du vernis). L'observation se fait en épifluorescence (filtre BP 340-380 nm et filtre LP 430 nm). Les lames se conservent à 4 °c en chambre noire.

## V. DOSAGE DE L'ŒSTRADIOL EN R.I.A.

Le dosage de l'œstradiol dans les différents milieux de culture des ovocytes a été réalisé en RIA (Radio Immuno Assay). Nous avons utilisé un kit de dosage d'œstradiol marqué à l'iode 125 (Orion Diagnostica SPECTRIA).

### 1. Principes du test.

Le principe du test est basé sur la technique de RIA (*figure 14*). Un échantillon contenant une quantité inconnue d'une substance à doser (antigène non marqué) est ajouté à une quantité standard de la même substance marquée (antigène marqué). Les antigènes marqués et non marqués sont alors capables d'entrer en compétition pour se lier à un nombre limité de sites de liaison à haute affinité au niveau des anticorps. Ces anticorps anti-antigène sont fixés dans les tubes tests par l'intermédiaire d'un anticorps anti-anticorps. Ceci permet de diminuer les problèmes stériques lors de la liaison de l'antigène sur l'anticorps anti-antigène.

Après avoir lavé les antigènes non liés, la quantité d'anticorps marqués dans le tube est inversement proportionnelle à la quantité d'antigènes non marqués présente dans l'échantillon à doser. La concentration d'antigène non marqué peut être estimée à l'aide d'une courbe standard (*figure 15*) établie avec des échantillons contenant des concentrations connues d'antigène non marqué.

### 2. Réactifs et solutions.

Les tubes tests sont donc coatés avec un premier anticorps de bouc anti-lapin auquel on lie ensuite un anticorps de lapin anti-œstradiol. La solution stock d'œstradiol marqué à l'iode 125 (avec 0.1 % de Kathon et un colorant rouge) est diluée 5 fois dans un dilueur contenant 0.1 % de Thimérosal (comme conservateur). Sept standards contenant 0, 50, 150, 500, 1500, 5000 et 15000 pmoles d'œstradiol par litre sont utilisés pour l'établissement de la



courbe standard. Ces standards contiennent en outre 0.1 % de Kathon et < 0.1 % de NaN<sub>3</sub> comme conservateurs. Enfin, une bouteille de concentré de lavage (à diluer 6 fois dans de l'eau distillée) est aussi fournie avec le kit.

On a bien sûr toute une série d'échantillons de milieux de maturation à doser qui ont été prélevés dans les milieux de maturation et de fécondation. Les échantillons contenant du FF ont été dilués 10 fois pour avoir une concentration d'œstradiol pour laquelle le kit a une bonne précision de mesure (zone la plus verticale de la courbe d'étalonnage).

**3. Méthode pour le dosage.**

Après avoir numéroté les tubes pour les standards, les contrôles et les échantillons, on ajoute dans les tubes correspondants 100 µl d'échantillon, de standard ou de contrôle. Seuls les tubes totaux (contrôles positifs) restent vides. Ensuite on met 500 µl de solution d'œstradiol marqué à l'iode 125 dans tous les tubes et on passe brièvement chaque tube au vortex. Les tubes test sont alors mis à l'incubation à 37°c pour 2 heures. Le test du back ground se fait dans un tube non coaté avec 100 µl de solution saline et 500 µl d'œstradiol marqué. On quantifie ainsi l'adsorption non spécifique d'œstradiol marqué sur les parois du tube.

Après l'incubation, on aspire le contenu de chaque tube et on ajoute 1 ml de solution de lavage (sauf pour les tubes totaux). On réaspire à nouveau et on laisse les tubes égoutter à l'envers sur du papier absorbant pendant au moins 5 minutes. Chaque tube passe enfin au compteur gamma (LKB Wallac 1277 Gammamaster) durant au moins une minute.

Le tableau 10 résume les différentes étapes.

*Tableau 10* : Etapes pour le dosage de l'œstradiol.

	Total count	Standard	Back ground	Echantillon
Pipetter échantillon		100 µl	100 µl	100 µl
Pipetter solution d'œstradiol marqué à l'iode 125	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Vortexer	non	oui	oui	oui
Incuber 2 h à 37°c	non	oui	oui	oui
Aspirer le contenu	non	oui	oui	oui
Laver avec 1 ml de solution de lavage	non	oui	oui	oui
Aspirer le contenu	non	oui	oui	oui
Doser durant 1 mn	oui	oui	oui	oui



#### 4. Calcul des résultats.

Le calcul de la concentration en oestradiol non marqué se base sur la formule :

$$A = A_0 * C_M / (C_M + C_F)$$

Avec A : la radioactivité de l'échantillon (cpm)

A<sub>0</sub> : la radioactivité du standard 0 pmol/L (cpm)

C<sub>M</sub> : La concentration en hormone marquée (pmol/L)

C<sub>F</sub> : La concentration en hormone non marquée (pmol/L).

Une valeur intéressante de A est celle pour laquelle  $A = A_0/2$ . On a alors :

$$A_0/2 = A_0 * C_M / (C_M + C_F)$$

Ou encore :

$$C_M + C_F = 2 * C_M$$

Par conséquent, pour cette valeur particulière de A,  $C_M = C_F$ .

On peut donc, grâce à la courbe d'étalonnage (et à la valeurs du total et du back ground), déterminer la valeur de C<sub>M</sub>.

Enfin, connaissant la valeur de C<sub>M</sub>, on peut déduire pour les différents tests la valeur de C<sub>F</sub> en transformant la formule de départ :

$$C_F = C_M * (A_0/A - 1)$$

La concentration en œstradiol peut être obtenue en pg/ml en multipliant la concentration en pmol/L par 0.2724. Elle aussi multipliée par 10 pour les échantillons qui ont été préalablement dilués 10 fois.

## VI. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS.

### 1. Résultats des maturations.

Les résultats des MIV permettent de calculer les taux de maturation, c'est-à-dire le rapport du nombre d'ovocytes maturés sur le nombre d'ovocytes mis en culture. Ce taux de maturation s'exprime en pourcents.

Lors de nos expériences, nous avons toujours utilisé le même fluide folliculaire (venant d'un seul pool de follicules), les mêmes solutions de facteurs de croissance (venant d'une même dilution ensuite aliquotée) et le même TCM199. De plus, nous avons respecté un volume de milieu de maturation constant pour tous les puits (335  $\mu$ l). Les différents puits ont toujours été réalisés en double pour qu'après les 24 heures de maturation il y ait un puits resté sans COC et correspondant donc au milieu de maturation avant traitement et un puits avec des COC correspondant lui au milieu de maturation après traitement. Le nombre de COC par puits est toujours resté de 6. Les contenus des différents puits (avant et après maturation) ont été prélevés et les échantillons congelés. Les dosages hormonaux ont été réalisés en une fois avec un kit (Orion Diagnostica SPECTRIA).

Toutes ces précautions facilitent et justifient les comparaisons statistiques entre les différentes manipulations.

Durant quatre semaines, les mêmes tests de maturation ont été effectués. Ainsi nous avons chaque fois un test négatif (sans fluide folliculaire (FF)), un test positif (avec FF), quatre tests avec les différents facteurs de croissance (IGF-I, IGF-II, bFGF et EGF) sans FF, et les mêmes quatre tests avec FF. Cela donne un total de dix tests dont 5 ont été effectués sans FF et 5 avec FF. On peut donc faire un tableau à deux entrées avec 5 colonnes pour les 5 tests et avec 2 lignes pour la présence ou l'absence de FF.

Ce tableau peut typiquement servir à une analyse statistique par test ANOVA 2 (Analyse de la variance à deux critères de classification). Les deux critères sont le GF (critère « a » qui possède 5 niveaux) et la présence ou l'absence de FF (critère « b » qui possède 2 niveaux). La répétition de mesure (k) est égale à 4. Le test ANOVA 2 nécessite bien sûr un test de Hartley qui permet de vérifier l'homogénéité des variances.

Ce test ne donne cependant pas beaucoup d'informations. Par exemple, on pourra dire qu'il y a un effet des facteurs de croissance, mais on ne saura pas préciser lequel. Il est donc intéressant de faire des comparaisons de moyenne 2 à 2 pour affiner nos conclusions. Ce problème peut être résolu grâce à des tests t de Student : chaque contrôle est comparé aux différents tests avec GF (en comparant les tests sans FF entre eux et les tests avec FF entre eux), puis on compare les tests avec GF entre eux (toujours en faisant la distinction avec ou sans fluide folliculaire). Enfin, pour pouvoir détecter les effets du FF, les différents tests sans FF sont comparés avec leurs homologues avec FF (exemple : EGF sans FF et EGF avec FF).

Tous ces tests sont effectués une deuxième fois après avoir éliminé les valeurs erratiques (à savoir des valeurs de 0 % de maturation pour un test qui donne dans les autres expériences, réalisées dans les mêmes conditions, des bons taux de maturation). Elles sont remplacées par la moyenne des trois autres mesures (1).

---

(1) Je tiens à remercier le laboratoire de biologie moléculaire structurale et en particulier mademoiselle K. de Fays pour les conseils et l'aide apportés lors de cette étude.



## **2. Résultats du dosage de l'œstradiol.**

Les mêmes tests que pour les taux de maturation (Hartley, ANOVA 2 croisée fixe, tests de Student) peuvent être effectués pour le dosage de l'œstradiol. Les taux de maturation sont ici remplacés par des sécrétions d'œstradiol par ovocyte. Nous avons préalablement fait la différence entre la concentration d'œstradiol après et avant maturation, ce qui nous donne la production d'œstradiol par ml. En ramenant à 335  $\mu$ l (le volume de milieu de maturation par puits) et en divisant par 6 (le nombre d'ovocytes par puits), on obtient la production d'œstradiol par ovocyte.

Les valeurs que nous avons cette fois-ci éliminées pour la deuxième série de tests sont celles qui sont négatives (très probablement dues à des erreurs de manipulation).

**TROISIEME PARTIE :**

**TRAVAIL PERSONNEL**



## **CHAPITRE I :** **MISE AU POINT DES TECHNIQUES.**

### **I. RECUPERATION DES OVOCYTES.**

#### **1. De l'abattoir au laboratoire.**

Les premières expériences furent plutôt infructueuses du point de vue de la récupération d'ovocytes de bonne qualité. Les taux de récupération ont pu être améliorés en contrôlant de manière plus stricte le maintien d'une température de 39°C. C'est ainsi que pour la dissection des ovaires, nous avons fait beaucoup plus attention à les plonger directement dans du liquide physiologique (NaCl 9%) maintenu à 39°C grâce à une boîte de polystyrène expansé remplie d'eau à 39°C. Pour maintenir une température la plus constante possible, cette eau était remplacée environ toutes les 20 minutes.

Pour éviter une trop grande proportion d'ovocytes dégénérés, le temps passé à l'abattoir a été limité à 1h30 afin de travailler avec un matériel biologique le plus frais possible.

#### **2. Ponction des follicules.**

Le taux de récupération (TR) normal d'ovocytes est de 1.5 par ovaire. Au départ, nous n'avions que 0.8 comme TR, ce qui était trop peu pour disposer du nombre d'ovocytes nécessaire pour tester simultanément les quatre facteurs de croissance.

Le TR a pu être amélioré en augmentant tout d'abord la force d'aspiration : le TR est ainsi passé de 0.8 pour une dépression de 20 mm Hg (avec 85 % de COC et 15 % d'ovocytes nus) à 1.5 pour une dépression de 30 mm Hg (avec 70 % de COC et 30 % d'ovocytes nus). Si la proportion d'ovocytes nus, qui ne sont pas utilisables pour les expériences suivantes, est plus grande, elle est largement compensée par un TR beaucoup plus élevé (pratiquement doublé).

Un second problème à résoudre consistait en une proportion anormale (5-10 %) d'ovocytes dégénérés (ce qui est visible grâce au cytoplasme qui s'obscurcit). Après divers essais, nous avons pu diminuer cette perte en rinçant régulièrement la tuyauterie du système de ponction par aspiration d'un peu de milieu de récolte (après avoir ponctionné 5-6 ovaires). Ceci permet d'entraîner les COC qui ont tendance à adhérer au tube reliant l'aiguille et l'éprouvette de collecte.

Toutes ces améliorations contribuent à obtenir un nombre suffisant de COC et à pouvoir choisir les plus beaux (au moins deux couches de cellules de cumulus continues autour de l'ovocyte) pour la mise en maturation.

## **II. MATURATION DES OVOCYTES.**

La mise au point des maturations a été assez difficile au début. En effet, aucune maturation n'était observée.

Le premier facteur que nous avons testé fut le pH. En effet, suite à des problèmes d'étuve et à une défaillance du système de contrôle du taux de CO<sub>2</sub>, le pH variait assez fort : passant de 9 (donc beaucoup trop basique) hors de l'étuve lors des manipulations à 6 (trop acide) dans l'étuve. Le milieu utilisé habituellement est le TCM199, qui ne contient aucun tampon, additionné d'hydrogénocarbonate de sodium qui, par l'équilibre qui se forme entre le CO<sub>2</sub> dissous (sous forme de carbonate) et le CO<sub>2</sub> gazeux (fixé théoriquement à 5 %), tamponne le milieu. Pour surmonter le mauvais fonctionnement de l'étuve à CO<sub>2</sub>, nous avons utilisé de l'HEPES qui équilibrait bien le pH aux environs de 7. Par après nous avons constaté que le système tampon dû au CO<sub>2</sub> marchait tout aussi bien si le taux de CO<sub>2</sub> gazeux restait de 5 % dans l'air et que l'on avait préalablement ajusté le pH de la solution à 7.3. (NB. Ce problème d'étuve et le remplacement du système de mesure du CO<sub>2</sub> ont pris assez longtemps !)

Malheureusement, malgré la résolution du problème du pH, les maturations ne se faisaient toujours pas. L'héparine fut ensuite soupçonnée d'empêcher la maturation extraovocytaire (c'est-à-dire l'expansion des cellules du cumulus). Mais même en évitant de l'utiliser dans le milieu de lavage contrairement à nos premières manipulations, les maturations n'étaient pas observées.

Enfin, suite à une communication personnelle d'Yves Cognié (INRA à Tours), nous avons testé différentes concentrations de FSH dans le milieu de maturation. La FSH permet de déclencher la fin de la maturation ovocytaire. Nous avons pu constater qu'en dessous de 10 ng/ml, la FSH n'a pas d'effet. Son action ne se manifeste qu'à partir de 50 ng/ml et augmente jusqu'à 100 ng/ml. En utilisant une concentration de FSH de 100 ng/ml, nous avons obtenu des taux de maturation allant de 90 à 100 % en présence de fluide folliculaire (nécessaire pour différents facteurs de croissance et hormones). Les deux (FSH et fluide folliculaire) restent nécessaires, l'un ne permettant pas la maturation sans l'autre (si l'on n'utilise pas de facteur de croissance).



**III. CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES.**

**1. Méthode du gradient de percoll.**

Le sperme utilisé pour ces expériences provient du bélier Texel Vicomte (numéro 01504 00652 et numéro sanitel BE2000 7513).

Théoriquement, la centrifugation sur gradient de percoll permet une séparation des spermatozoïdes vivants et morts. Cette technique se base sur une différence de densité inexpliquée qui existe entre les spermatozoïdes morts et vivants : les vivants sont un peu plus denses et vont donc se retrouver préférentiellement dans le culot tandis que les morts restent à l'interface des deux solutions de percoll (45 et 90 %). Le dilueur reste au-dessus du percoll.

Pratiquement, la technique n'a pas bien marché lors de nos expérimentations. En effet, malgré les différents essais, tous les spermatozoïdes restaient à l'interface entre les deux concentrations de percoll. La vitesse de centrifugation était de 2500 RPM (pendant 20'), ce qui est un maximum si l'on ne veut pas trop abîmer les spermatozoïdes. Des résultats du même style avaient déjà été enregistrés au laboratoire auparavant. Nous avons donc plutôt utilisé la technique de swim-up ou migration ascendante.

**2. Méthode du swim-up.**

La méthode du swim-up consiste à concentrer les spermatozoïdes en un culot, les couvrir d'une nouvelle solution, dite de capacitation, et laisser les gamètes les plus vigoureux envahir cette solution.

Diverses vitesses de centrifugation ont été testées. Le tableau 1 résume les résultats obtenus.

Tableau 1 : Résultats des essais de swim-up.

Vitesse (RPM)	Temps (minutes)	Résultat
1500 (*)	4	Après 30', les spermatozoïdes n'ont toujours pas remonté : la centrifugation étant trop forte, ils ont été trop culotés, ce qui les empêche de sortir du culot.
1000	2 fois 2'	Bien culotés.
1000	4'	Bien culotés : le culot est suffisamment lâche pour laisser remonter les spermatozoïdes vivants.

(\*) Cette centrifugation a été précédée d'une première pour laver les spermatozoïdes ; le surnageant a été ensuite enlevé et le culot resuspendu avec du milieu de capacitation pour la deuxième centrifugation.

La centrifugation idéale est donc de 1000 RPM pendant 4', après quoi on enlève le surnageant et l'on remet du milieu de capacitation pour le swim-up. La première centrifugation est effectuée avec du milieu de capacitation additionné de gentamycine pour éliminer le plus de germes possible.

D'autres essais ont été effectués. En effet, la quantité de spermatozoïdes récupérés restait faible : une bonne partie était perdue dans le culot. C'est pourquoi nous avons essayé une technique un peu différente : le culot a été resuspendu avec 200 µl de milieu de capacitation et 2 ml de ce même milieu ont ensuite été déposés délicatement au dessus (sans resuspendre le culot faiblement dilué). Ainsi, les spermatozoïdes étant moins empêtrés, les vivants ont plus de chances de remonter. Nous avons obtenu un peu plus de spermatozoïdes vivants, mais la perte restait quand même grande.

Afin d'avoir un sperme capacité de meilleure qualité, nous avons fait des essais avec du sperme frais.

### **3. Utilisation du sperme frais.**

Le sperme frais est d'avance de meilleure qualité que le sperme congelé. En effet, seuls 50 % des spermatozoïdes dans les meilleurs cas survivent au traitement de congélation. Par contre, dans le sperme frais, on a environ 95 % de vivants. Par conséquent, les diverses manipulations visant à séparer les spermatozoïdes morts des vivants ne sont plus nécessaires. Cela évite au sperme une série de traitements qui diminuent de toute façon la viabilité et la vitalité des gamètes.

On effectue une ou deux centrifugations de lavage pour débarrasser le sperme du liquide séminal. Ces centrifugations sont un peu plus importantes que pour le sperme congelé (7' à 2000 RPM). Etant donné que les spermatozoïdes ne sont plus déshydratés comme dans les paillettes, ils sont plus volumineux et sédimentent moins vite. Le culot est alors resuspendu dans un volume défini de milieu de capacitation et est rajouté tel quel aux puits de fécondation contenant les ovocytes.

Deux essais préliminaires ont été programmés afin d'analyser l'effet de la congélation, de la nature du milieu de capacitation et de la présence de cryoprotecteurs sur la survie des spermatozoïdes et leur capacitation. Faute de temps, aucune réplique de ces essais n'a pu être réalisée.



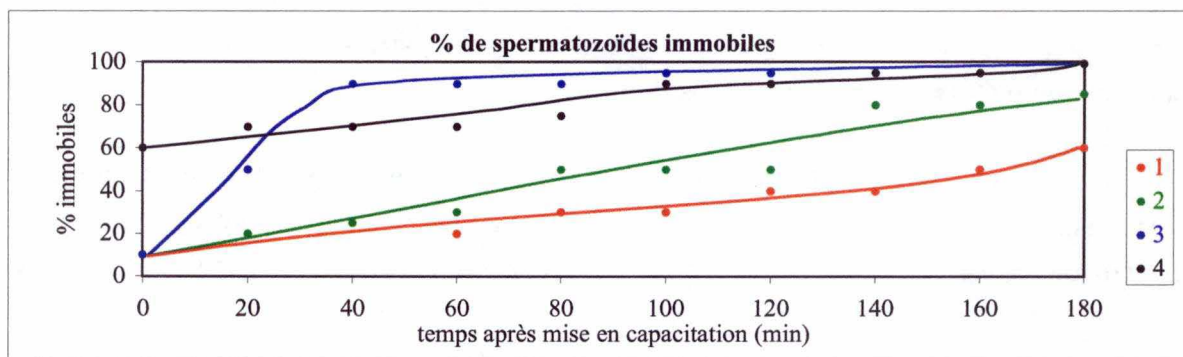


Figure 1 : Pourcentage de spermatozoïdes immobiles en fonction du temps.

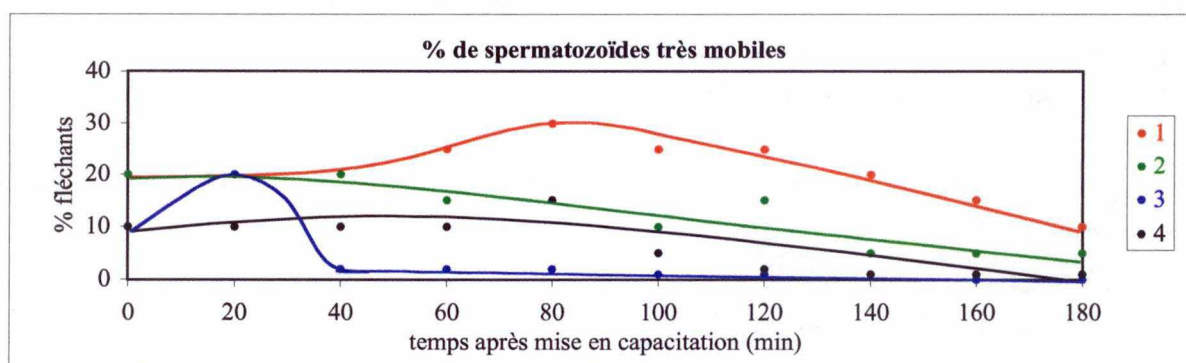


Figure 2 : Pourcentage de spermatozoïdes très mobiles en fonction du temps.

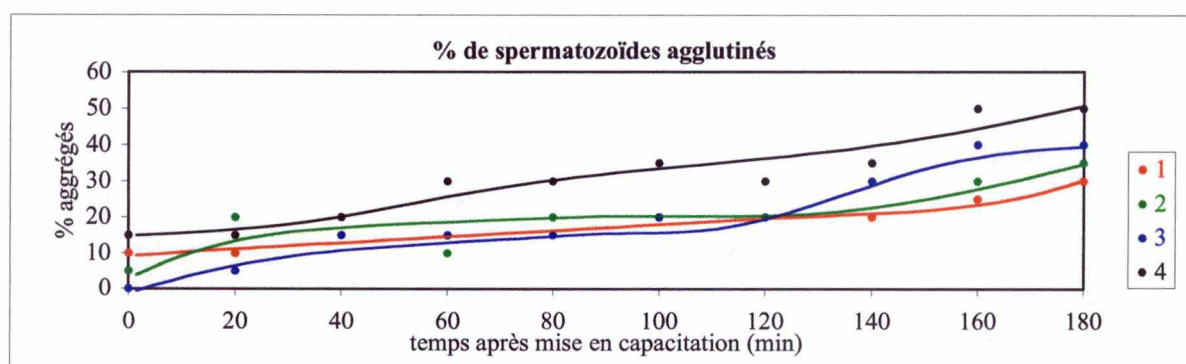


Figure 3 : Pourcentage de spermatozoïdes agglutinés en fonction du temps.

### 3.1. Essai 1.

Nous avons effectué différents tests de capacitation avec du sperme frais. Le premier visait à étudier la capacitation du sperme dans différents milieux :

- Tube 1 : 250 µl de sperme frais dilué avec du DBB à 400 millions de spermatozoïdes par ml plus 500 µl de milieu de capacitation.
- Tube 2 : 250 µl de sperme frais dilué avec du DBB additionné de 20 % de jaune d'œuf et de 10 % de glycérol (comme pour la congélation) à 400 millions de spermatozoïdes par ml plus 500 µl de milieu de capacitation.
- Tube 3 : 250 µl de sperme frais dilué avec du DBB à 400 millions de spermatozoïdes par ml plus 500 µl de DBB.
- Tube 4 : 250 µl de sperme congelé (qui a été dilué à 400 millions de spermatozoïdes par ml avec du DBB additionné de 20 % de jaune d'œuf et de 10 % de glycérol) plus 500 µl de milieu de capacitation.

Le sperme frais provient du bélier Ile de France Alençon (numéro 272 06045970140 et numéro sanitel BE9000 5170). Les paillettes de sperme congelé viennent du bélier Vicomte.

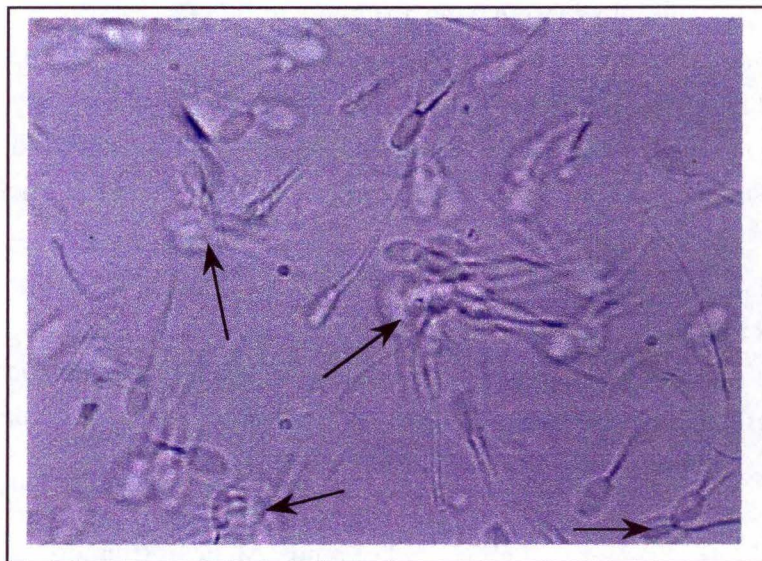
Les résultats provenant d'une estimation visuelle au microscope (grossissement x 150) concernent les pourcentages de spermatozoïdes immobiles (et non fécondants ; *figure 1*), très mobiles (et donc potentiellement fécondants ; *figure 2*) et agrégés (c'est-à-dire qui sont déjà trop capacités et qui ne sont plus fécondants ; *figures 3 et 4*). La somme de ces valeurs pour un tube à un instant considéré ne vaut pas nécessairement 100 %. En effet, elle peut être plus faible (les spermatozoïdes peu mobiles n'ont pas été représentés), ou plus élevée (les spermatozoïdes agrégés deviennent immobiles après un certain temps). Les différentes durées sont exprimées en minutes après la mise en capacitation. Les numéros 1 à 4 correspondent aux 4 tubes tests.

Toutes les durées doivent être additionnées des 50 minutes de manipulations à 39°C (dilutions, centrifugations) qui ont précédé la mise en capacitation au bain-marie.

#### 3.1.1. Tube test numéro 1.

C'est environ 80 à 100 minutes après le début des lectures (130-150 minutes de manipulations) que le sperme frais mis à capacer dans le milieu de capacitation est le plus motile avec 30 % de spermatozoïdes très motiles et fléchants, ce qui confirme le temps de 2 à 4 h de capacitation proposé dans la littérature pour le sperme frais. Les taux de spermatozoïdes immobiles et agglutinés sont relativement faibles (respectivement 30 et 20 %) et les plus bas des quatre tubes.





*Figure 4* : Agrégats de spermatozoïdes (désignés par les flèches).

### 3.1.2. Tube test numéro 2.

Dans le tube 2 où la semence fraîche était conservée dans du dilueur additionné de cryoprotecteurs avant d'être diluée avec du milieu de capacitation habituel, la semence reste bonne moins longtemps. Elle se dégrade environ 40 minutes plus tôt que celle du tube test 1. On savait que les cryoprotecteurs (glycérol) sont assez toxiques pour les spermatozoïdes à 39°C, ce qui est vérifié ici. Après 80 minutes (130 minutes réelles), le sperme se dégrade rapidement, le taux de spermatozoïdes immobiles atteignant 50 %.

### 3.1.3. Tube test numéro 3.

Le troisième tube test a été mis au programme afin d'étudier la possibilité de remplacer le milieu de capacitation habituel par le DBB qui permet une longue conservation des spermatozoïdes à 4°C.

Après 40 minutes seulement (90 minutes réelles), la proportion de spermatozoïdes immobiles atteint 90 %. Le dilueur ne convient donc pas pour l'induction de la capacitation à 39°C. Néanmoins, il est permis de se poser des questions sur la qualité du dilueur du lot utilisé pour cet essai. En effet, comme le montre l'expérience 2, la conservation des gamètes à 4°C n'a pas été bonne non plus.

### 3.1.4. Tube test numéro 4.

Dans le tube 4 contenant des spermatozoïdes congelés puis dégelés dans le DBB avec cryoprotecteurs et dilué dans le milieu de capacitation habituel, le taux de spermatozoïdes immobiles est au départ de 60 % (à peu près la moitié des spermatozoïdes sont tués par la congélation-décongélation). La proportion de spermatozoïdes très mobiles augmente pendant 80 minutes (jusqu'à 110-130 minutes après le début des manipulations) pour ensuite diminuer rapidement. Ces résultats corroborent le temps de capacitation habituellement préconisé pour le sperme congelé, 1 à 2 heures, nettement plus court que pour le sperme frais.

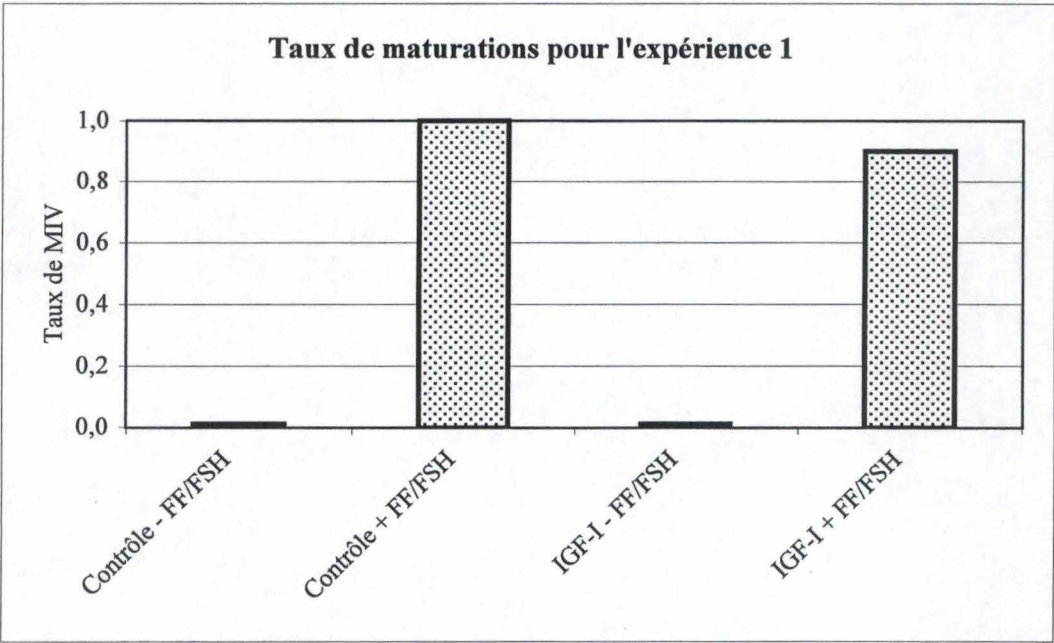
## 3.2. Essai 2.

Pour le second essai, c'est le même sperme que nous avons utilisé. Il a passé une nuit à 4°C après avoir été dilué à 400 millions de gamètes par ml dans du DBB. Dès le début de la mise en capacitation, nous avons observé une mauvaise qualité des gamètes (60 % de spermatozoïdes immobiles et 20 % d'agglutinés). Ceci est probablement dû d'une part à la mauvaise qualité du DBB et d'autre part à la nuit passée à 4°C qui permet normalement une bonne conservation mais qui n'est pas recommandée.



### 3.3. Conclusion.

Nous avons décidé que pour les expériences de fécondation in vitro suivantes nous utiliserions pour la mise en fécondation (que l'on effectue aux environs de midi, le lendemain de la mise en maturation) du sperme frais du matin, capacité dans du milieu de capacitation habituel après un lavage dans du milieu de capacitation additionné de gentamycine.



**Figure 5** : Taux de maturation comparés pour des COC cultivés dans des milieux contrôle et supplémentés ou non en IGF-I et en FF+FSH.



## **CHAPITRE II :** **RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.**

### **I. MATURATIONS.**

#### **1. Taux de maturation.**

##### **1.1. Rappels préliminaires.**

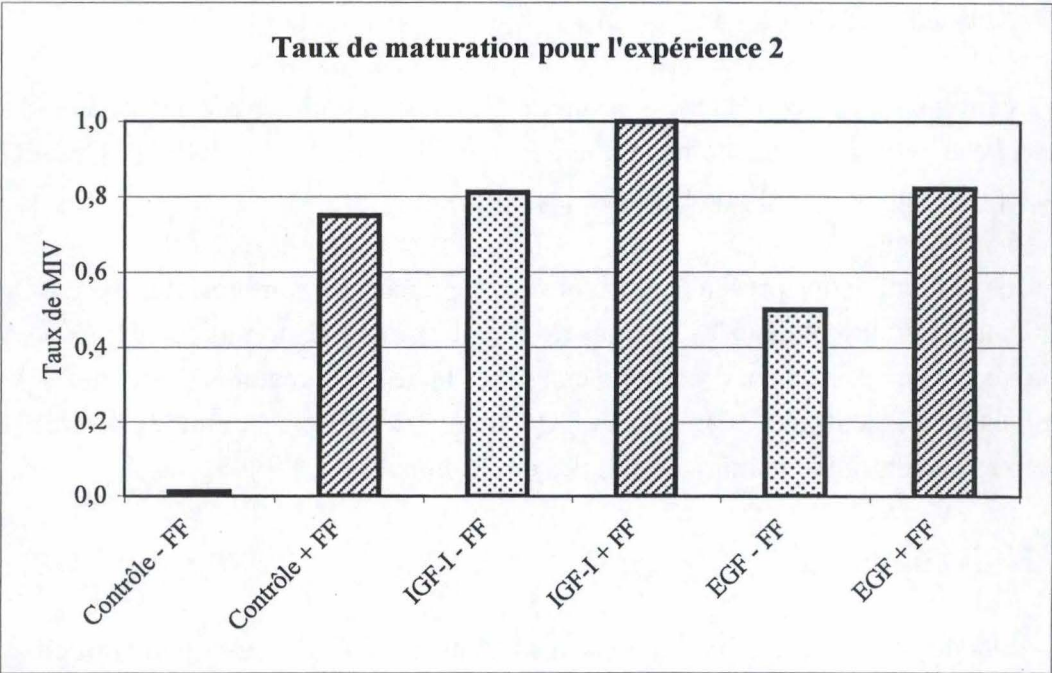
Les expériences consistent à comparer les résultats des MIV effectuées dans un milieu de base (contrôle) ou contenant un facteur de croissance (IGF, bFGF, EGF) et additionné (+ FF) ou non (- FF) de fluide folliculaire.

Les résultats sont présentés en tableaux reprenant le nombre total de COC mis à maturer (Total), le nombre de COC maturés (MIV), le nombre de non maturés (non MIV), les indéterminés (?), et enfin le taux (compris entre 0 et 1) de COC maturés (Taux de MIV). Les indéterminés concernent généralement les COC dont l'expansion du cumulus est difficile à affirmer en raison du faible nombre de cellules qui le composent.

##### **1.2. Expérience 1.**

Lors de l'expérience 1, nous avons mis à maturer 38 COC dans quatre milieux différents. Le premier (Contrôle - FF/FSH) est un milieu à base de TCM199 et de bicarbonate ne contenant ni fluide folliculaire, ni FSH, ni facteur de croissance. Il constitue le contrôle négatif de l'expérience. Le contrôle positif (Contrôle + FF/FSH) contient quant à lui du FF (10 %) et de la FSH (100 ng/ml). Le troisième milieu (IGF-I - FF/FSH) a la même composition que le contrôle négatif, sauf que l'on y a ajouté de l'IGF-I à 10 ng/ml. Enfin, le dernier milieu (IGF-I + FF/FSH) contient du FF, de la FSH et de l'IGF-I.

Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Les résultats sont donnés dans le tableau 1 et illustrés par la *figure 5*.



**Figure 6** : Taux de maturation comparés pour des COC cultivés dans des milieux contrôle (contenant de la FSH) et supplémentés ou non en FF et en divers facteurs de croissance.



Tableau 1 : Résultats des maturations in vitro lors de l'expérience 1.

	Total	MIV	non MIV	?	Taux de MIV
<b>Contrôle - FF/FSH</b>	9	0	9	0	0
<b>Contrôle + FF/FSH</b>	9	9	0	0	1
<b>IGF-I - FF/FSH</b>	10	0	10	0	0
<b>IGF-I + FF/FSH</b>	10	9	1	0	0,9

Les résultats, qui seront analysés statistiquement plus loin, montrent qu'aucune maturation ne se passe dans un milieu ne contenant ni FF ni FSH, même si ce milieu est supplémenté en IGF-I. Par contre, les COC mis à maturer en présence de FSH et de FF ont présenté une expansion de la corona radiata. Le taux de maturation égalant alors 1, l'IGF-I ne saurait pas améliorer cet effet.

### 1.3. Expérience 2.

Dans la deuxième expérience, comme dans celles qui suivent, le milieu préparé pour la MIV contient toujours de la FSH (100 ng/ml), et ceci pour tous les tests. Ceci permet en effet d'étudier uniquement les effets des facteurs de croissance et celui du FF dans le but de remplacer ce dernier. Les facteurs de croissance sont toujours ajoutés à la concentration de 10 ng/ml.

Les 94 ovocytes ont été répartis dans les 6 milieux testés lors de l'expérience. Ces milieux sont, dans l'ordre, le contrôle négatif (sans FF), le contrôle positif (avec 10 % de FF), un test sans FF et avec IGF-I, un test avec FF et IGF-I, un test sans FF et avec EGF, et enfin un test contenant du FF et de l'EGF.

Les résultats sont donnés dans le tableau 2 et illustrés à la *figure 6*.

Tableau 2 : Résultats des maturations in vitro lors de l'expérience 2.

	Total	MIV	non MIV	?	Taux de MIV
<b>Contrôle - FF</b>	15	0	15	0	0
<b>Contrôle + FF</b>	15	9	3	3	0,75
<b>IGF-I - FF</b>	20	13	3	4	0,81
<b>IGF-I + FF</b>	14	10	0	4	1
<b>EGF - FF</b>	15	4	4	7	0,5
<b>EGF + FF</b>	15	9	2	4	0,82

Les résultats montrent qu'en absence de FF et de facteur de croissance, aucune maturation n'a été observée. Par contre la présence du FF donne un taux de maturation de 0.75. Dans le milieu sans FF, l'IGF-I peut remplacer le FF, tandis que l'EGF semble ne pas être aussi efficace que le FF.

En présence de FF, l'EGF donne un taux de maturation comparable à celui qui est obtenu en son absence. Il n'y a donc pas d'effet additif entre le FF et l'EGF. Par contre l'IGF-I donne un taux de maturation plus élevé (1) que pour le FF seul, ce qui indique l'existence d'un effet additif entre le FF et l'IGF-I.

1.4. Expériences 3, 4, 5 et 6.

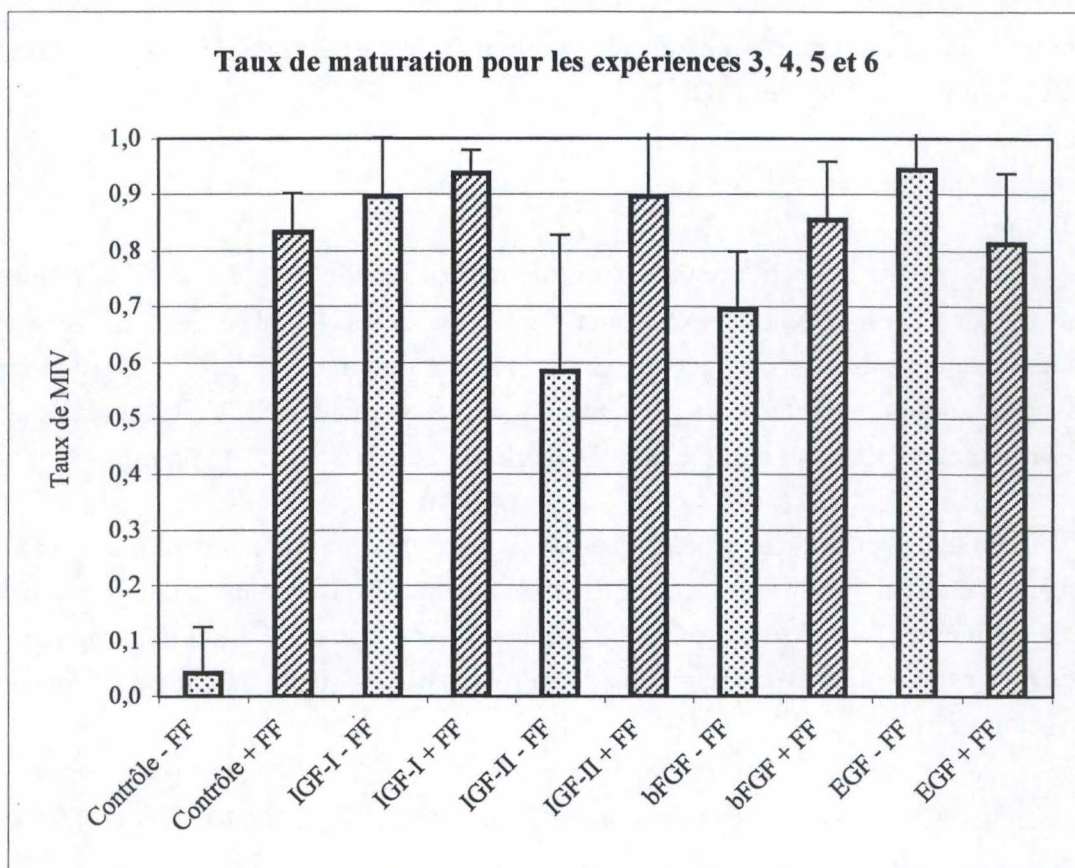
Comme dans l'expérience 2, le contrôle négatif ne contient pas de FF contrairement au contrôle positif. Ensuite, nous avons quatre paires de tests (IGF-I, IGF-II, bFGF et EGF), avec dans chaque paire un premier test sans FF et le deuxième avec FF. Les facteurs de croissance sont toujours ajoutés à la concentration de 10 ng/ml, et le fluide folliculaire à 10 %. Tous les milieux contiennent comme dans l'expérience 2 de la FSH à 100 ng/ml.

Cette expérience a été répétée quatre fois dans des conditions identiques : même FF (provenant d'un seul groupe de gros follicules), même FSH (venant d'une seule dilution aliquotée) et mêmes facteurs de croissance (venant aussi d'une seule dilution aliquotée). C'est pour ces raisons que nous avons rassemblé les résultats de ces quatre expériences dans un seul tableau (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats des maturations in vitro lors de l'expérience 3, 4, 5 et 6.

	Total	MIV	non MIV	?	Taux de MIV	Moyenne ± écart-type
Contrôle - FF	6	0	6	0	0	0,04 ± 0,08
	6	0	6	0	0	
	6	0	6	0	0	
	6	1	5	0	0,17	
Contrôle + FF	6	5	1	0	0,83	0,87 ± 0,09
	6	5	0	1	1	
	6	4	1	1	0,8	
	6	5	1	0	0,83	
IGF-I - FF	6	5	0	1	1	0,90 ± 0,12
	6	4	1	1	0,8	
	6	6	0	0	1	
	6	4	1	1	0,8	





**Figure 7** : Moyennes des taux de maturation (sans les valeurs erratiques) comparés pour des COC cultivés dans des milieux contrôle (contenant de la FSH) et supplémentés ou non en FF et en divers facteurs de croissance.

<b>IGF-I + FF</b>	6	5	0	1	1	1,00 ± 0,00
	6	5	0	1	1	
	6	6	0	0	1	
	6	5	0	1	1	
<b>IGF-II - FF</b>	6	0	6	0	(0)	0,46 ± 0,42
	6	2	4	0	0,33	
	6	3	3	0	0,5	
	6	5	0	1	1	
<b>IGF-II + FF</b>	6	4	2	0	0,67	0,92 ± 0,17
	6	6	0	0	1	
	6	6	0	0	1	
	6	5	0	1	1	
<b>bFGF - FF</b>	6	5	1	0	0,83	0,55 ± 0,38
	6	0	6	0	(0)	
	6	3	1	2	0,75	
	6	3	2	1	0,6	
<b>bFGF + FF</b>	6	6	0	0	1	0,91 ± 0,11
	6	4	0	2	1	
	6	5	1	0	0,83	
	6	4	1	1	0,8	
<b>EGF - FF</b>	6	6	0	0	1	0,75 ± 0,40
	6	1	5	0	(0,17)	
	6	5	1	0	0,83	
	6	6	0	0	1	
<b>EGF + FF</b>	6	5	0	1	1	0,89 ± 0,13
	6	3	1	2	0,75	
	6	5	0	1	1	
	6	4	1	1	0,8	

La *figure 7* représente les moyennes obtenues après avoir enlevé les valeurs erratiques (mises entre parenthèses dans le tableau). Celles-ci étaient trop éloignées des trois autres valeurs pour le même test. Elles ont été remplacées par la moyenne des trois autres mesures.

Les résultats montrent que l'absence de facteur de croissance et de fluide folliculaire empêche la maturation des COC. Si l'on ajoute du FF, le taux de maturation monte à 0,87. L'adjonction d'un facteur de croissance en absence de FF permet la maturation d'une certaine proportion de COC.



Parmi les facteurs de croissance, c'est l'IGF-I qui donne les meilleurs résultats en donnant des taux de maturation comparables à ceux qui sont obtenus avec le FF. L'EGF permet aussi une bonne maturation et les taux sont également élevés (si l'on enlève les valeurs erratiques). Le bFGF et l'IGF-II donnent des taux de maturation faibles.

Le seul facteur de croissance à avoir un effet additif avec le FF est l'IGF-I, les autres donnant (en présence de FF) des taux proches de ceux qui sont obtenus avec le FF seul.

Ces résultats sont analysés statistiquement ci-après afin de comparer les effets respectifs des facteurs de croissance et du FF.

## **2. Analyse statistique.**

### **2.1. Présentation des analyses.**

L'analyse statistique porte sur les expériences 3 à 6 (tableau 3) uniquement, les deux premières ne comportant pas de répétition de mesure.

Pour rappel, dans le test de Hartley (test d'homogénéité des variances), AHo signifie que l'on accepte l'hypothèse nulle, c'est-à-dire l'hypothèse d'homogénéité des variances. C'est dans seulement ce cas que l'on peut continuer une analyse par ANOVA. Un RHo signifie que l'on doit arrêter l'analyse par ANOVA car on risquerait de tirer des conclusions erronées.

Dans le test ANOVA, AHo signifie qu'il n'y a pas d'effet du facteur (FF, GF,...) considéré. Un RHoS et un RHoSS permettent de conclure qu'une différence significative existe entre deux des valeurs du tableau sans pour autant pouvoir préciser lesquelles. Les probabilités d'avoir raison sont respectivement de 0.95 et de 0.99.

En ce qui concerne les tests bidirectionnels de Student, RHoS et RHoSS signifient qu'une différence significative existe entre les deux moyennes considérées. Les probabilités sont ici de 0.975 et de 0.995.

### **2.2. Résultats pour les données brutes.**

#### **2.2.1. Test de Hartley et ANOVA.**

Les résultats des calculs effectués lors des analyses statistiques pour les résultats bruts des maturations in vitro sont repris dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats des tests de Hartley et ANOVA.

Test de Hartley	AHo
Test ANOVA 2 croisé fixe :	
Effet d'un des facteurs	RHoSS
Effet d'un GF	RHoSS
Effet du FF	RHoSS
Interaction	RHoS

Il existe donc un effet hautement significatif des facteurs de croissance et du fluide folliculaire ainsi qu'une interaction significative entre ces paramètres.

2.2.2. Tests de Student.

Les résultats ont été comparés 2 à 2 par des tests de Student précédés d'un test de Fischer. Les résultats ont été résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats des tests de Student pour la comparaison des différents paramètres.

		P=0,975	P=0,995
Contrôle - FF	IGF-I - FF	RHoS	RHoSS
Contrôle - FF	IGF-II - FF	*	
Contrôle - FF	bFGF - FF	*	
Contrôle - FF	EGF - FF	*	
Contrôle + FF	IGF-I + FF	RHoS	AHo
Contrôle + FF	IGF-II + FF	AHo	AHo
Contrôle + FF	bFGF + FF	AHo	AHo
Contrôle + FF	EGF + FF	AHo	AHo
IGF-I - FF	IGF-II - FF	AHo	AHo
IGF-I - FF	bFGF - FF	AHo	AHo
IGF-I - FF	EGF - FF	AHo	AHo
IGF-II - FF	bFGF - FF	AHo	AHo
IGF-II - FF	EGF - FF	AHo	AHo
bFGF - FF	EGF - FF	AHo	AHo
IGF-I + FF	IGF-II + FF	AHo	AHo
IGF-I + FF	bFGF + FF	AHo	AHo
IGF-I + FF	EGF + FF	AHo	AHo
IGF-II + FF	bFGF + FF	AHo	AHo
IGF-II + FF	EGF + FF	AHo	AHo
bFGF + FF	EGF + FF	AHo	AHo



Contrôle - FF	Contrôle + FF	RHoS	RHoSS
IGF-I - FF	IGF-I + FF	AHo	AHo
IGF-II - FF	IGF-II + FF	AHo	AHo
bFGF - FF	bFGF + FF	AHo	AHo
EGF - FF	EGF + FF	AHo	AHo

(\*) Les comparaisons pour lesquelles il n'y a pas de résultats n'ont pas été calculées à cause d'un trop grand écart entre les variances (test de Fisher).

Grâce à cette analyse, nous pouvons confirmer plusieurs des conclusions tirées à partir du tableau 3. L'addition du FF augmente bien significativement le taux de maturation, ainsi que l'IGF-I dans un milieu sans FF. Enfin, l'effet additif entre le FF et l'IGF-I est significatif.

2.3. Résultats pour les données sans les valeurs erratiques.

2.3.1. Test de Hartley et ANOVA.

Dans cette analyse, les tests montrent un effet hautement significatif de tous les paramètres ainsi qu'une interaction hautement significative (tableau 6).

Tableau 6 : Résultats des tests de Hartley et ANOVA.

Test de Hartley	AHo
<b>Test ANOVA 2 croisé fixe :</b>	
Effet d'un des facteurs	RHoSS
Effet d'un GF	RHoSS
Effet du FF	RHoSS
Interaction	RHoSS

2.3.2. Tests de Student.

Le tableau 7 récapitule les résultats des comparaisons 2 à 2 des différents tests.

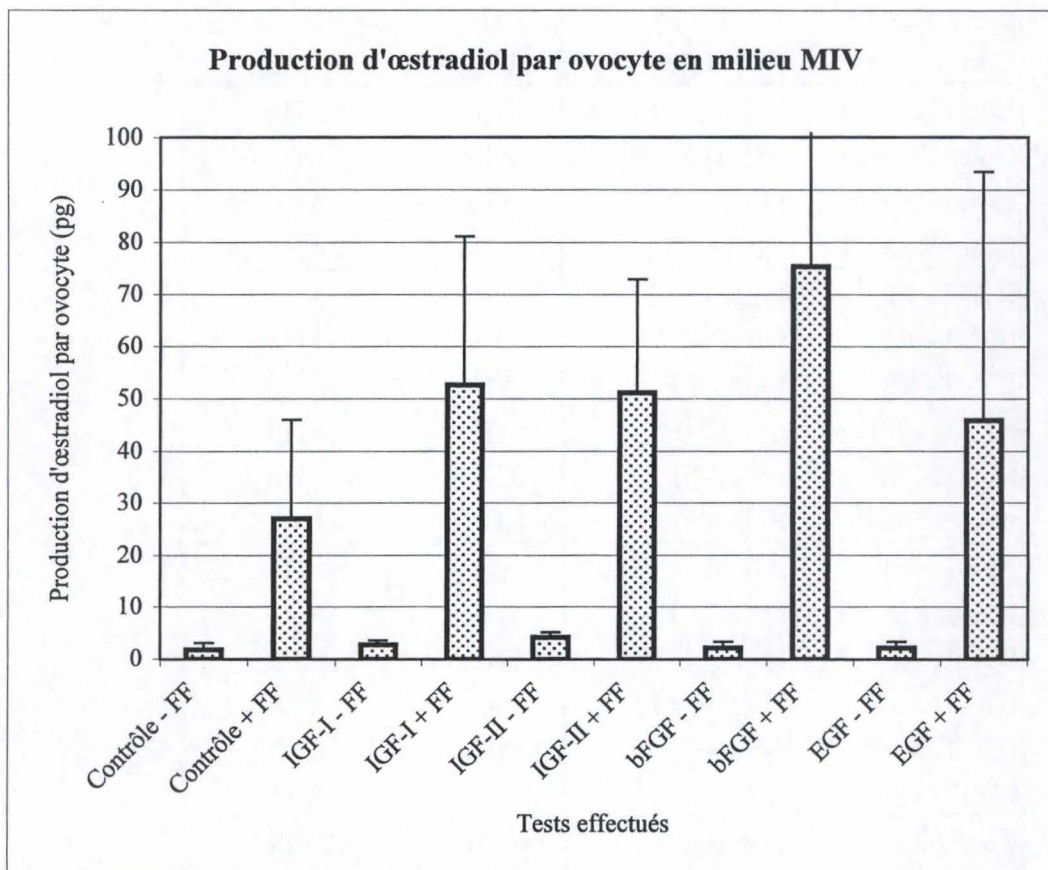
*Tableau 7* : Résultats des tests de Student pour la comparaison des différents paramètres sans les valeurs erratiques.

		97,50%	99,50%
Contrôle - FF	IGF-I - FF	RHoS	RHoSS
Contrôle - FF	IGF-II - FF	RHoS	RHoSS
Contrôle - FF	bFGF - FF	RHoS	RHoSS
Contrôle - FF	EGF - FF	RHoS	RHoSS
Contrôle + FF	IGF-I + FF	RHoS	AHo
Contrôle + FF	IGF-II + FF	AHo	AHo
Contrôle + FF	bFGF + FF	AHo	AHo
Contrôle + FF	EGF + FF	AHo	AHo
IGF-I - FF	IGF-II - FF	AHo	AHo
IGF-I - FF	bFGF - FF	RHoS	AHo
IGF-I - FF	EGF - FF	AHo	AHo
IGF-II - FF	bFGF - FF	AHo	AHo
IGF-II - FF	EGF - FF	RHoS	AHo
bFGF - FF	EGF - FF	RHoS	RHoSS
IGF-I + FF	IGF-II + FF	AHo	AHo
IGF-I + FF	bFGF + FF	AHo	AHo
IGF-I + FF	EGF + FF	AHo	AHo
IGF-II + FF	bFGF + FF	AHo	AHo
IGF-II + FF	EGF + FF	AHo	AHo
bFGF + FF	EGF + FF	AHo	AHo
Contrôle - FF	Contrôle + FF	RHoS	RHoSS
IGF-I - FF	IGF-I + FF	AHo	AHo
IGF-II - FF	IGF-II + FF	AHo	AHo
bFGF - FF	bFGF + FF	AHo	AHo
EGF - FF	EGF + FF	AHo	AHo

De toutes les comparaisons effectuées, il ressort que le FF possède un effet hautement significatif en absence de facteur de croissance. De même, tous les facteurs de croissance considérés, pris en particulier, possèdent une influence hautement significative sur les résultats de la MIV en absence de FF.

En présence de FF, seul l'IGF-I montre une différence significative. Mais la différence entre les effets des divers facteurs de croissance n'est jamais significative, sauf si on effectue un test de Student unirectionnel : l'IGF-I stimule alors significativement plus la maturation que l'IGF-II ( $P=0.95$ ). La différence est aussi significative en absence de FF entre IGF-I et bFGF, entre IGF-II et EGF et entre bFGF et EGF.





**Figure 8** : Production d'œstradiol par ovocyte lors de la maturation.

### **3. Conclusions.**

En l'absence de FF et de FSH dans le milieu de maturation, les COC ne mûrissent pas, tandis que si on y met ces deux substances, on obtient des taux de maturation allant de 0.75 à 1. La FSH seule ne permet pas les maturations, tout comme le FF seul, comme nous avons pu le remarquer lors de nos premières expériences (voir mise au point des techniques) où nous utilisions une concentration de FSH trop faible. De même, l'IGF-I n'a pas d'effet en absence simultanée de FSH et de FF.

Si, en présence de FSH et en absence de FF, un des quatre facteurs de croissance étudiés est ajouté dans le milieu de culture, le taux de maturation est chaque fois nettement augmenté et cet effet est plus important pour l'IGF-I et l'EGF que pour l'IGF-II et le bFGF. En présence de FSH et de FF, seul l'IGF-I a un effet améliorateur sur la maturation.

## **II. FECONDATIONS.**

Sur plus ou moins 300 ovocytes maturés qui ont été mis en fécondation, seuls deux ont été fécondés. Il y a deux raisons à cela. Premièrement, la mise au point de la capacitation des spermatozoïdes a pris longtemps et n'a pas permis de faire les fécondations dans de bonnes conditions et deuxièmement, nous avons rencontré beaucoup de difficultés à avoir un milieu stérile après avoir ajouté le sperme dans les puits de fécondation. Les analyses statistiques sont donc sans fondement.

## **III. PRODUCTION D'ŒSTRADIOL.**

### **1. Concentrations.**

Lors des analyses des concentrations en œstradiol dans les milieux de maturation, quatre valeurs négatives (dans les tests contrôle - FF, IGF-I + FF, bFGF + FF et EGF - FF) ont été observées. Nous les avons supprimées dans le calcul et l'analyse des résultats et les avons remplacées par la moyenne des trois autres mesures du même test.

Les moyennes et les écarts-types ont été calculés à raison de quatre mesures par test (1 pour chaque expérience 3, 4, 5 et 6) et sont présentés dans le tableau 8 et illustrés à la *figure 8*. Ils montrent que le FF induit toujours une réponse des COC en matière de sécrétion d'œstradiol. Cette sécrétion est faible et variable lorsque les GF sont présents seuls dans le milieu de MIV.



*Tableau 8* : Résultats (moyennes et écarts-types) du dosage d'œstradiol dans les milieux de maturation des expériences 3, 4, 5 et 6.

	Moyenne production d'œstradiol ± écart-type (pg)
Contrôle - FF	2 ± 1
Contrôle + FF	27 ± 19
IGF-I - FF	3 ± 1
IGF-I + FF	53 ± 29
IGF-II - FF	4 ± 1
IGF-II + FF	51 ± 22
bFGF - FF	2 ± 1
bFGF + FF	75 ± 55
EGF - FF	2 ± 1
EGF + FF	46 ± 48

**2. Analyse statistique.**

**3.1. Test de Hartley et ANOVA.**

Le test de Hartley nous conduisant à rejeter l'hypothèse d'une homogénéité de variances, nous ne pouvons pas continuer une analyse par ANOVA. Nous allons directement passer à des tests de Student.

**3.2. Tests de Student.**

Les résultats des comparaisons des moyennes pour les différents tests de Student sont donnés dans le tableau 9.

Tableau 9 : résultats des tests de Student pour la comparaison des différents paramètres.

		97,50%	99,50%
Contrôle - FF	IGF-I - FF	AHo	AHo
Contrôle - FF	IGF-II - FF	RHoS	AHo
Contrôle - FF	bFGF - FF	AHo	AHo
Contrôle - FF	EGF - FF	AHo	AHo
Contrôle + FF	IGF-I + FF	AHo	AHo
Contrôle + FF	IGF-II + FF	AHo	AHo
Contrôle + FF	bFGF + FF	AHo	AHo
Contrôle + FF	EGF + FF	AHo	AHo
IGF-I - FF	IGF-II - FF	AHo	AHo
IGF-I - FF	bFGF - FF	AHo	AHo
IGF-I - FF	EGF - FF	AHo	AHo
IGF-II - FF	bFGF - FF	RHoS	AHo
IGF-II - FF	EGF - FF	RHoS	AHo
bFGF - FF	EGF - FF	AHo	AHo
IGF-I + FF	IGF-II + FF	AHo	AHo
IGF-I + FF	bFGF + FF	AHo	AHo
IGF-I + FF	EGF + FF	AHo	AHo
IGF-II + FF	bFGF + FF	AHo	AHo
IGF-II + FF	EGF + FF	AHo	AHo
bFGF + FF	EGF + FF	AHo	AHo
Contrôle - FF	Contrôle + FF	*	
IGF-I - FF	IGF-I + FF	*	
IGF-II - FF	IGF-II + FF	*	
bFGF - FF	bFGF + FF	*	
EGF - FF	EGF + FF	*	

(\*) Les tests de Student calculés par l'ordinateur sont RHoS (sauf pour l'IGF-I et l'EGF) mais le test de Fisher n'autorise pas ce calcul en raison d'une différence de variances trop importante.



### **3. Conclusions.**

Les analyses montrent qu'en absence de FF, on n'a qu'une très faible production d'œstradiol. Par contre, lorsqu'on ajoute du FF, la production d'œstradiol augmente nettement.

Parmi les résultats analysés, seul l'IGF-II possède un effet significativement favorable sur la production d'œstradiol par les COC en l'absence de FF, et que cet effet se manifeste aussi par rapport au bFGF et à l'EGF. Si l'IGF-I ne semble pas avoir d'effet avec le test de Student bidirectionnel, il en a un d'après le test de Student unidirectionnel ( $P=0,9$ ).

Lorsque le FF est présent dans le milieu, les facteurs de croissance ont des effets, mais les résultats ne permettent pas une interprétation statistique.

# QUATRIEME PARTIE :

## DISCUSSION DES RESULTATS



## I. MATURATIONS.

Pour faciliter la compréhension de la discussion, voici une description de la maturation finale de l'ovocyte avant l'ovulation. La maturation nucléaire signifie la reprise de la méiose : bloquée au stade de la prophase de la première division réductionnelle, elle reprend soudain jusqu'en métaphase de la deuxième division, atteinte une heure avant l'ovulation. Elle peut parfois s'observer après une fixation de l'ovocyte grâce au premier globule polaire qui est rejeté en périphérie sous la zone pellucide. La maturation extraovocytaire désigne les modifications se produisant au niveau des cellules de la granulosa entourant l'ovocyte : des protéases sont sécrétées et permettent à l'ovocyte de se détacher de la paroi du follicule par rupture du cumulus oophorus pour flotter dans le fluide folliculaire. Les cellules du cumulus s'éloignent alors les unes des autres pour former la corona radiata. Enfin, la maturation cytoplasmique comporte différents phénomènes : contraction du cytoplasme, rupture des jonctions ovocyte-cellules périovocytaires, migration des mitochondries et de différentes vésicules au centre du cytoplasme et marginalisation contre la paroi des granules corticaux.

Un premier aspect intéressant à considérer dans nos résultats (figure 7) est l'influence du FF et de la FSH sur la maturation ovocytaire. Celle-ci ne se fait pas dans un milieu sans fluide folliculaire ni FSH. De même, les taux de maturation restent nuls en présence du FF ou de la FSH seuls. Par contre, la présence simultanée de la FSH et du FF ensembles donne des taux de maturation proche de 1. On peut donc en conclure que le FF et la FSH sont tous deux nécessaires pour la maturation *in vitro*, un seul de ces deux composants ne suffit pas. D'après la littérature, ceci avait d'ailleurs déjà été observé (Rath et al., 1995).

Nous nous sommes efforcés de déterminer dans quelle mesure certains facteurs de croissance pourraient remplacer le FF dans les milieux de maturation. Quatre facteurs de croissance (IGF-I, IGF-II, bFGF et EGF) ont été testés.

En présence de FSH et en l'absence de FF, l'addition de chacun des facteurs améliore nettement et de manière variable le taux de maturation (0.90 pour l'IGF-I, 0.46 pour l'IGF-II, 0.55 pour le bFGF et 0.75 pour l'EGF).

En l'absence de FSH, l'apport d'IGF-I ne permet pas de maturation, ce qui confirme le rôle prépondérant de la FSH, pour permettre aux FF et à l'IGF-I d'exercer leurs effets sur la maturation.

La comparaison des quatre facteurs de croissance indique que l'IGF-I serait le plus efficace avec l'EGF, les deux autres étant moins actifs.



Dans la littérature, l'IGF-II est connu pour avoir un effet stimulateur sur la maturation *in vitro* d'ovocytes bovins tandis que l'IGF-I a des effets variables suivant les espèces. Il est souvent observé une absence d'effet sur la MIV d'ovocytes ovins, alors que chez le porc, l'IGF-I stimule la MIV en présence de FSH (Singh et Armstrong, 1996 ; Sirotkin et al., 1998).

Il a été montré (Singh et Armstrong, 1996) chez le porc qu'un des composants importants du sérum de veau fœtal utilisé pour la MIV est l'IGF-I. Ce facteur est d'ailleurs tout aussi présent dans le FF où il est intensément sécrété par les cellules de la granulosa (Monget, 1993). Singh et Armstrong (1996) ont démontré que l'IGF-I est un composant du sérum de veau fœtal qui permet aux cellules du cumulus de s'expanser en réponse à la FSH *in vitro*. Il semble donc que cette synergie indispensable entre la FSH et l'IGF-I existe également pour la maturation de l'ovocyte ovin.

En ce qui concerne le bFGF, il a été identifié comme étant un facteur essentiel chez les bovins pour l'induction de la protéolyse au niveau de la matrice extracellulaire des cellules du cumulus qui permet une expansion de celui-ci (Bieser et al., 1998).

L'EGF possède quant à lui un effet important sur la MIV. Il stimule l'expansion du cumulus et la maturation méiotique des COC bovins (Lorenzo et al., 1995). Chez le porc, il stimule la maturation nucléaire et cytoplasmique des ovocytes *in vitro* (Uhm et al., 1998). Chez le lapin, différents résultats semblent indiquer qu'il existe des effets stéroïdiens dépendants de l'EGF sur la MIV. Enfin, l'effet positif de l'EGF sur la MIV se retrouve aussi chez le chien (Russ et al., 1998). Il est cependant difficile d'observer toutes ces modifications de l'ovocyte (maturation nucléaire, cytoplasmique) dans nos expériences étant donné que la seule qui est observable directement sans fixation est l'expansion du cumulus, signe de la maturation extraovocytaire.

Nous nous sommes aussi efforcés d'étudier l'existence d'un effet additif entre les GF et le FF. Si l'action du facteur de croissance reste inchangée en présence de FF, on peut conclure que ce GF est probablement déjà présent dans le FF et qu'une augmentation de concentration ne change pas grand-chose. Par contre, si l'effet en est augmenté, cela signifie soit qu'il n'est pas présent, ou en quantité insuffisante, dans le FF, soit qu'une molécule présente dans le FF potentialise son action.

Les données illustrées par la figure 7 montrent que les taux de MIV obtenus avec les facteurs de croissance en présence de FF sont toujours supérieurs à ceux qui sont obtenus avec les facteurs de croissance en son absence, sauf pour l'EGF. Cependant, le seul GF pour lequel il y a un effet additif significatif est l'IGF-I ( $P=0.975$ ). Cela peut être expliqué par une stimulation plus grande due à une concentration en IGF-I plus élevée (IGF-I présent dans le



FF plus l'IGF-I du milieu MIV). De plus, il existe dans le FF toute une série d'IGF-BP qui modulent l'action des IGF. Certaines pourraient augmenter l'action de l'IGF-I en facilitant l'accès ou l'interaction avec son récepteur. Les activités exactes des IGF-BP restent cependant mal connues (Cohick et Clemmons, 1993).

Le fait que l'on n'observe pas d'effet additif des autres facteurs de croissance avec le FF peut être dû au fait qu'ils sont déjà présents dans le FF ou qu'une autre molécule présente dans le FF a la même action qu'eux. De toutes manières, il serait difficile de déceler une différence entre le contrôle positif et ces tests avec FF étant donné que tous les taux de maturation sont proches de 0.9 (ce qui est dû au FF) : il faudrait une grande répétition de mesures, un nombre important d'ovocytes par test pour avoir une très faible différence entre les variances. C'est dans ces conditions que l'on peut mettre à jour des différences plus faibles. Les conclusions doivent donc être tirées avec précaution au vu de ces tests.

Entre les différents tests avec FF, aucune différence significative n'a pu être montrée entre les différents facteurs de croissance. Les valeurs de taux de maturation sont trop proches et les variances trop grandes pour mettre à jour d'aussi faibles écarts entre les moyennes. En effet, la présence du FF donne de toute manière un taux de maturation de l'ordre de 0.85, ce qui est déjà assez élevé. Les valeurs obtenues lors de l'ajout d'un facteur de croissance ne peuvent donc être beaucoup plus grandes que ce taux.

## II. PRODUCTION D'ŒSTRADIOL.

Nous avons choisi d'exprimer les résultats du dosage de l'œstradiol en quantité produite par COC (*figure 8*) pendant le temps de la MIV. Même si chaque COC n'a pas le même nombre de cellules de cumulus (qui produisent l'œstradiol), on peut penser que, vu le nombre total d'ovocytes pour chaque test (4\*6 soit 24), on a un certain équilibre entre les différents tests. De plus, l'utilisation du même FF (qui contient de l'œstradiol) pour tous les tests avec FF permet de faire des comparaisons entre les 4 expériences (3, 4, 5 et 6) pour lesquelles nous avons fait le dosage.

Tout d'abord, on peut constater un effet important du fluide folliculaire. En effet, on passe d'une production d'œstradiol de 2 pg en absence de FF à une production de 27 pg en présence de FF. Le FF a donc un effet très marqué sur la production d'œstradiol.

En ce qui concerne l'effet des facteurs de croissance, il reste très limité : on observe des productions ne dépassant pas 4.1 pg par COC en absence de FF. L'effet de ce dernier est donc beaucoup plus important dans ce cas. Cela peut-être dû à la présence dans le FF d'un ou de facteurs stimulateurs de la synthèse d'œstradiol. De plus, le FF contient de grandes



quantités d'œstradiol, qui pourrait stimuler sa propre production. En effet, l'œstradiol stimule la croissance et la différenciation des cellules de la granulosa, ce qui augmente probablement la production d'œstradiol.

Dans les tests sans FF, le seul facteur de croissance à avoir un faible effet significatif ( $P=0.975$ ) est l'IGF-II. D'après les calculs statistiques, l'IGF-I stimule aussi la production d'œstradiol, mais la probabilité est plus faible ( $P=0.9$ ). Les IGF sont connus pour induire in vivo la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa, mais c'est surtout l'IGF-I qui est tenu pour responsable de l'induction de l'activité aromatasase provoquant la production d'œstradiol par les cellules granulosales à partir des androgènes produits par les cellules thécales (Davis et al., 1990 ; Campbell et al., 1995 ; Noël et al., 1998a).

Même si l'effet de l'IGF-I est moins évident du point de vu statistique, il est quand même significativement plus élevé que celui de l'EGF, du bFGF et du contrôle -, ce qui rejoint les données de la littérature. Par contre, on montre un effet de l'IGF-II sur la production d'œstradiol qui est peu décrit dans la littérature. Il faudrait pousser plus loin l'étude pour confirmer ce résultat intéressant.

Une explication de cette différence entre nos résultats par rapport aux données de la littérature peut aussi venir du fait que celle-ci étudie surtout la stéroïdogénèse au niveau des follicules in vitro. Or, les COC ne contiennent que des cellules de la granulosa particulières, les cellules du cumulus, contrairement aux follicules dans lesquels elles ne représentent qu'une minorité. Cette différence de cellules pourrait expliquer que la réponse des COC à la stimulation des IGF, du point de vue de la stéroïdogénèse, soit différente de celle des follicules.

Pour les autres facteurs (bFGF et EGF), on ne peut pas mettre en évidence un effet significatif sur la production d'œstradiol. Il faudrait un nombre de réplicats plus grand, une précision plus importante lors du dosage pour pouvoir réduire la variance et déceler une éventuelle différence avec le contrôle négatif.

Dans les tests avec FF, les résultats ne suivent pas vraiment la même tendance. L'addition des quatre facteurs de croissance semble aussi avoir un effet nettement stimulateur et celui qui possède le plus d'effet est le bFGF avec une production d'œstradiol de 75 pg par COC, les trois autres semblant avoir une action moindre. Cependant, ces différences avec le contrôle positif et entre les tests ne peuvent être évaluées statistiquement.



Le fait que, pour la production d'œstradiol, le fluide folliculaire est nettement actif par rapport aux quatre facteurs de croissance peut être expliqué par la présence dans le FF de substances (hormones, cytokines, BP,...) qui sont elles même actives ou qui peuvent moduler l'action des GF.

### **III. COMPARAISON DES EFFETS SUR LA MATURATION ET SUR LA PRODUCTION D'ŒSTRADIOL.**

Lorsqu'on compare l'effet des facteurs de croissance et du fluide folliculaire sur la maturation in vitro et sur la production d'œstradiol par les COC, on peut faire des observations intéressantes.

Le fluide folliculaire est sans conteste le facteur le plus adéquat pour la production d'œstradiol : c'est lui qui donne les meilleurs résultats. Par contre, sur la maturation, il égale plus ou moins les facteurs de croissance. Mais il en va tout autrement pour les facteurs de croissance : s'ils suffisent, du moins IGF-I, pour remplacer le FF dans la maturation, ils sont largement insuffisants en ce qui concerne la production d'œstradiol. Le FF contient donc sûrement des substances fortement stimulatrices pour la sécrétion d'œstradiol. De plus, si les facteurs de croissance semblent pouvoir remplacer le FF pour la maturation, il faudrait voir s'ils permettent aussi d'obtenir des taux de fécondation suffisants, et s'ils donnent la possibilité à l'ovocyte d'acquérir la compétence nécessaire pour un développement embryonnaire ultérieur.

Enfin, il ressort que l'œstradiol ne semble pas nécessaire à la maturation des ovocytes ovins tout au moins en ce qui concerne l'expansion du cumulus. En effet, les maturations peuvent se dérouler en absence de FF pour autant que des facteurs de croissance soient ajoutés dans le milieu. Et d'autre part, ces facteurs de croissance ne stimulent pas ou n'induisent que très faiblement la production d'œstradiol par les cellules du cumulus.



**CONCLUSIONS**

**ET PERSPECTIVES**



Le but de ce mémoire était de mesurer les effets de facteurs de croissance (GF) sur la maturation in vitro (MIV), sur la fécondation in vitro (FIV) et sur la production d'œstradiol par comparaison à ceux du fluide folliculaire (FF). Ainsi, on pourrait mettre au point une solution de facteurs de croissance et d'hormones capable de remplacer le FF dans la technique de MIV.

Au niveau de la MIV, nous avons montré que l'absence de FF et de FSH ne permet pas la maturation, pas plus que le FF ou la FSH seuls. Seule l'association des deux donne des taux de maturation élevés.

En absence de FSH, l'IGF-I n'a pas d'effet. Ceci renforce la thèse d'une action synergique de la FSH et d'autres substances. En effet, en présence de FSH, les quatre facteurs de croissance (IGF-I, IGF-II, bFGF et EGF) étudiés possèdent tous un effet positif sur la maturation in vitro, avec une action beaucoup plus importante de l'IGF-I et de l'EGF.

En présence de FSH et de FF, il est plus difficile de différencier l'effet des différents facteurs de croissances étant donné que l'association des deux suffit à elle seule pour stimuler efficacement la maturation. Néanmoins, on observe un effet améliorateur de l'IGF-I.

En ce qui concerne la production d'œstradiol, l'effet des facteurs de croissance reste très faible en absence et en présence de FF, tandis que celui de ce dernier, qui contient probablement d'autres facteurs stimulants, est élevé. Vu que les facteurs de croissance, sans permettre une grande production d'œstradiol, donnent des taux de maturation plus élevés, on peut conclure que l'œstradiol et la production d'œstradiol ne sont pas nécessaires pour la MIV, en tout cas pas en forte concentration.

Nos expériences ont donc montré que la possibilité de remplacer le fluide folliculaire par des facteurs de croissance pour stimuler la maturation des ovocytes est réelle : l'IGF-I et l'EGF seuls donnent déjà des taux de maturation aussi élevés que le fluide folliculaire.

Cependant, il faudrait aller plus loin dans l'analyse des effets des GF. Tout d'abord, il faudrait mettre au point la fécondation in vitro et le développement embryonnaire pour évaluer l'action des GF au niveau des taux de fécondation, des taux de clivage, de la qualité des embryons et du taux de blastocystes obtenus et transférables dans un utérus et mesurer ainsi les effets sur l'acquisition de la « compétence » ovocytaire.

D'autres facteurs de croissance seraient aussi très intéressants à étudier. Je pense notamment au TGF $\beta$ 1 qui stimule la maturation extraovocytaire. Les interférons et plus particulièrement l'interféron tau sont aussi très importants, principalement dans le développement embryonnaire (surtout l'IFN $\tau$  chez les ruminants).

Enfin, après avoir décortiqué toutes les actions des GF sur la MIV et l'acquisition de la compétence à la fécondation et au développement embryonnaire, il faudrait tester toutes les combinaisons des GF actifs pour tenter par exemple d'obtenir un mélange où le GF numéro 1 stimulerait la MIV sans permettre l'acquisition d'une compétence au développement embryonnaire et où le GF numéro 2 stimulerait l'acquisition de cette compétence.

Ces expériences donneraient ainsi naissance à une solution de divers facteurs de croissance et autres hormones capable de remplacer le FF. Finis ainsi tous les problèmes liés à l'utilisation d'un fluide corporel complexe, inconstant, et pouvant contenir des toxines, des germes.

Les perspectives sont donc énormes pour ce sujet de recherche dont la conclusion aura des applications très importantes dans le domaine de la culture cellulaire.



# REFERENCES

# BIBLIOGRAPHIQUES



- Aggarwal BB.** Tumor necrosis factor. Dans Gutterman JU, Aggarwal BB (Eds), « Human cytokines handbook for basic and clinical researchers », Blackwell ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Albertini DF, Elvin J, Matzuk MM, Carabastos MJ.** Growth differentiation factor-9 : a novel member that regulates ovarian follicular development. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 133.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** « Molecular biology of the cell » 1989, Garland Publishing. ISBN 0-8240-3695-6.
- Amento EP, Beck LS.** TGF-beta and wound healing. *Ciba foundation symposium* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Amit T, Dirnfeld M, Barkey RJ, Peleg I, Hacham H, Abramovici H, Blumenfeld Z.** Growth hormone-binding protein (GH-BP) levels in follicular fluid from human preovulatory follicles : correlation with serum GH-BP levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 ; 77 : 33-39.
- Anasti JN, Kalantaridou SN, Kimzey LM, George M, Nelson LM.** Human follicle fluid vascular endothelial growth factor concentrations are correlated with luteinization in spontaneously developing follicles. *Hum Reprod* 1998 ; 13(5) : 1144-1147.
- Ando M, Yoshimur Y, Iwashita M, Oda T, Karube M, Ubukata Y, Jinno M, Nakamura Y.** Direct ovarian effect of growth hormone in the rabbit. *Am J Reprod Immunol* 1992 ; 131 : 123-132.
- Arteaga CL, Carty-Dugger T, Moses HL, Hurd SD, Pietenpol JA.** Transforming growth factor beta 1 can induce estrogen-independent tumourigenicity of human breast cancer cells in athymic mice. *Cell Growth Diff* 1993; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Asselin E, Lacroix D, Fotier MA.** IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1997 ; 132 : 117-126.
- Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK.** Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 643-654.
- Austin CR, Short RV (Eds).** « Hormones in reproduction » 1972, Cambridge University Press. ISBN 521-09696-0.
- Austin DJ, Ishikawa M, Das SK, Dey SK, Klagsbrun M, Nowak RA.** Heparin-binding epidermal growth factor is expressed in human endometrium and stimulates proliferation of endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 214.
- Badinga L, Song S, Yang J, Collante WR, Simmen RCM, Simmen FA.** Recombinant porcine insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) interacts with human insulin-like growth factor-II (IGF-II) to modulate human and porcine uterine epithelial cell proliferation. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 104.



- Balwant S, Armstrong DT.** Insulin-like growth factor I, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol reprod* 1997 ; 56 : 1370-1375.
- Barker-Gibb ML, Clarke IJ.** Increased galanin and neuropeptide-Y immunoreactivity within the hypothalamus of ovariectomised ewes following a prolonged period of reduced body weight is associated with changes in plasma growth hormone but not gonadotropin levels. *Neuroendocrinology* 1996 ; 64 : 194-207.
- Basilico C, Moscatelli D.** The FGF family of growth factors and oncogens. *Adv Cancer Res* 1992; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Bassett JM.** Early changes in plasma insulin and growth hormone levels after feeding in lambs and adult sheep. *Aust J Biol Sci* 1974 ; 27 : 157-166.
- Bauer MK, Breier BH, Harding JE, Veldhuis JD, Gluckman PD.** The fetal somatotrophic axis during long term maternal undernutrition in sheep : evidence for nutritional regulation in utero. *Endocrinol* 1995 ; 136 : 1250-1257.
- Bauman DE.** Bovine somatotropin : review of an emerging animal technology. *J Dairy Sci* 1992 ; 75 : 3432-3451.
- Baumann G, Stolar MW, Ambrun K, Barsano CP, De Vries BC.** A specific growth hormone-binding protein in human plasma : initial characterization. *J Clin Endocrinol* 1986 ; 62 : 134-141.
- Baumann G, Mercado M.** Growth hormone-binding proteins in plasma. *Nutrition* 1993 ; 9 : 546-553.
- Baumbach WR, Bingham B.** One class growth hormone (GH) receptor and binding protein messenger ribonucleic acid in rat liver, GHR1, is sexually dimorphic and regulated by GH. *Endocrinology* 1995 ; 136 : 749-760.
- Bazer FW, Spencer TE, Ott TL.** Placental interferons. *Am J Reprod Immunol* 1996 ; 35 : 297-308.
- Bazer FW, Spencer TE, Ott TL.** Interferon tau : a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 1997 ; 37 : 412-420.
- Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, Schlessinger J, Jaye M, Dionne CA.** Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Besnard N, Pisselet C, Monniaux D, Monget P.** Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein -2, -3, -4, and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 1050-1058.
- Bick T, Hochberg Z, Amit T, Isaksson OGP, Jansson JO.** Role of pulsability and continuity of growth hormone (GH) administration in the regulation of hepatic GH-receptor and circulating GH-binding protein and insulin-like growth factor-I. *Endocrinol* 1992 ; 1 : 423-429.



- Bieser B, Stojkovic M, Wolf E, Meyer H, Einspanier R.** Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biol reprod* 1998 ; 59 : 801-806.
- Bingham B, Oldham ER, Baumbach WR.** Regulation of growth hormone receptor and binding protein expression in domestic species. *Proceedings/Society for Experimental Biology and Medicine* 1994 ; 206 : 195-199.
- Bister JL, Perrad B, Noël B, Lagache F, Paquay R.** Exogenous GH administrations stimulate the ovarian activity in ewes during the anoestrus. *J Reprod Fertil* 1994 ; 49 : 18-19.
- Bister JL.** « La reproduction assistée chez l'homme et les mammifères domestiques » 1998, cours donné aux Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CM, Sawyer HR.** Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 381-386.
- Briddell RA, Bruno E, Cooper RJ, Brandt JE, Hoffman R.** Effect of c-kit ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Blood* 1991; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Brison DR, Schultz RM.** Apoptosis during mouse blastocyst formation : evidence for a role for survival factors including transforming growth factor  $\alpha$ . *Biol Reprod* 1997a ; 56 : 1088-1096.
- Brison DR, Schultz RM.** Transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ ) regulates apoptosis in mouse blastocysts : analysis of TGF $\alpha$  knockout embryos using TUNEL. *J Reprod Fertil* 1997b ; 19 : 10.
- Brison DR, Schultz RM.** Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor  $\alpha$ -deficient mouse blastocysts. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 136-144.
- Brown RE.** The pituitary gland and its hormones. Dans Brown RE (Ed) « An introduction to neuroendocrinology » 1994, Cambridge university press, Canada, 30-39.
- Burgess WH, Maciag T.** The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Bush MR, Mele JM, Couchman GM, Walmer DK.** Evidence of juxtacrine signaling for transforming growth factor  $\alpha$  in human endometrium. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 1522-1529.
- Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A, Comoglio PM.** Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor with stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R.** IGF-I stimulates oestradiol production in sheep, both in vitro and in vivo. *J Reprod and Fertil* 1995 ; 16 : 17.



- Carlsson B, Nilsson OGP, Billig H.** Growth hormone messenger RNA in the rat ovary : regulation and localization. *Mol Cell Endocrinol* 1993 ; 95 : 59-66.
- Charnock-Jones DS, Clark DE, Licence D, Wooding FBP, Smith SK.** Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and binding sites at the maternal-fetal interface throughout gestation in the pig. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 231.
- Choi D, Rohan RM, Rosenfeld RG, Matsumoto T, Gargosky SE, Adashi EY.** Activin-attenuated expression of transcripts encoding granulosa cell-derived insulin-like growth factor-binding proteins -4 and -5 in the rat : a putative antiatretic effect. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 508-515.
- Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-jones DS.** A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 1540-1548.
- Cohick WS, Clemmons DR.** The insulin-like growth factors. *Annu rev physiol.* 1993 ; 55 : 131-153.
- Correia da Silva G, Teixeira N, Pringle H, Bell SC.** Expression of insulin-like growth factors-I and -II (IGF-I, IGF-II) mRNA by rat non-pregnant and pregnant uterine tissues. *J Reprod Fertil* 1993 ; 12 : 15.
- Davis SR, Smith JF, Gluckman PD.** Effects of growth hormone injections on ovulation rate in ewes. *Reprod Fertil Dev.* 1990 ; 2 : 173-8.
- Dawson A, Reynolds TS, Boulton M, Peters AR.** Expression of the mRNA for IGF-II and type-1 IGF receptor in the ovary of sow throughout the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1997 ; 19 : 47-48.
- De la Sota RL, Simen FA, Thatcher WW.** Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol Reprod* 1996 ; 55 : 803-812.
- Derynck R.** The biological complexity of transforming growth factor  $\beta$ . Dans Thompson A (Ed), « Cytokine handbook », 1994 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Dey SK.** Ligand-receptor signalling of EGF-related growth factors in implantation. *J Reprod Fertil* 1995 ; 16 : 4.
- Doldi N, Bassan M, Bonzi V, Ferrari A.** Effects of growth hormone and growth hormone-releasing hormone on steroid synthesis in cultured hyman luteinizing granulosa cells. *Gynecol Endocrinol* 1996 ; 10 : 101-108.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM.** Growth/differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996 ; 383 : 531-535.
- Doraiswamy V, Moor RM, Dai Y, Reynolds LP, Redmer DA.** Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine ovary during the preovulatory period. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 123.



- Doraiswamy V, Reynolds LP, Redmer DA.** Expression and localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in ovine corpora lutea (CL) throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 146.
- Driver PM, Forbes JM.** Episodic growth hormone secretion in sheep in relation to time of feeding, spontaneous meals and short term fasting. *J Physiol* 1981 ; 317 : 413-424.
- Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL, Behrman HR.** Effects of insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 891-897.
- Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL.** Insulin and insulin-like growth factors stimulate proliferation of human ovarian theca-interstitial cells. *Fertil Steril* 1998 ; 69(2) : 335-340.
- Eckery DC, Moeller CL, Nett TM, Sawyer HR.** Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol Reprod* 1997 ; 57 : 507-513.
- Eisenhauer KM, Chung S-Y, Billig H, Hsueh AJW.** Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor-binding protein. *Biol Reprod* 1995 ; 53 : 13-20.
- Elde R, Cao YH, Cintra A, Brelje TC, Pelto-Huikko M, Junttila T, Fuxe K, Pettersson RF, Hökfelt T.** Prominent expression of acidic fibroblast growth factor in motor and sensory neurones. *Neuron* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996 ; 32A no 14, 2413-2422.
- Flores JM, Sanchez MA, Garcia P, Sanchez B, Nieto A.** Immunohistochemical localization of epidermal growth factor, transforming growth factor  $\alpha$  and growth factors  $\beta$  in the caprine peri-implantation period. *Theriogenology* 1998 ; 50 : 931-944.
- Fraser HM, Lunn SF, Kim H, Erickson GF.** Localization of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) mRNA in the primate ovary. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 113.
- Frelin C, Ladoux A, Bauters C.** VEGF : médiateur de l'angiogenèse hypoxique. *Méd/Sci* 1997 ; 13 : 886-891.
- Gabler C, Lauer B, Einspanier A, Schams D, Einspanier R.** Detection of mRNA and immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct. *J Reprod Fertil* 1997 ; 109 : 213-221.
- Gabler C, Einspanier R.** Effects of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2, estradiol and progesterone on the expression of the FGF receptor (FGFR) in cultures of bovine oviduct epithelial cells. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 216.
- Gandolfi F.** embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 95-98.



- Gardner RL, Squire S, Zaina S, Hills S, Graham CF.** Insulin-like growth factor-II regulation of conceptus composition : effects of the trophectoderm and inner cell mass genotypes in the mouse. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 190-195.
- Garrette B (Ed).** Eurêka, « numéro spécial fécondation in vitro » 1999.
- Gherardi E, Stoker M.** Hepatocyte growth factor-scatter factor : mitogen, motogen, and met. *Cancer cells* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Gong JG, Bramley T, Webb R.** The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers : follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod* 1991 ; 45 : 941-949.
- Gong JG, Bramley T, Webb R.** The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fertil* 1993a ; 97 : 247-254.
- Gong JG, Bramley T, Webb R.** Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol Reprod* 1993b ; 48 : 1141-1149.
- Graff KJ, Meintjes M, Dyer VW, Paul JB, Denniston RS, Ziomek C, Godke RA.** Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology* 1999 ; 51 : 1099-1119.
- Grove BH, Lewis M, Mak J, Erikson ME, Unemori EN.** Relaxin is a potent and specific stimulator of vascular endothelial growth factor expression in normal human endometrial cells in vitro. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 191.
- Gupta A, Bazer FW, Dekaney CM, Ing NH, Jaeger LA.** Expression of beta transforming growth factors (TGF $\beta$ s) in the porcine peri-implantation uterus. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 142.
- Gupta A, Ing NH, Bazer FW, Bustamante LS, Jaeger LA.** Beta transforming growth factors (TGF $\beta$ ) at the porcine conceptus-maternal interface. Part I : expression of TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$ 3 messenger ribonucleic acid. *Biol Reprod* 1998a ; 59 : 905-910.
- Gupta A, Dekaney CM, Bazer FW, Madrigal MM, Jaeger LA.** Beta transforming growth factors (TGF $\beta$ ) at the porcine conceptus-maternal interface. Part II : uterine TGF $\beta$  bioactivity and expression of immunoreactive TGF $\beta$ s (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$ 3) and their receptors (type I and type II). *Biol Reprod* 1998b ; 59 : 911-917.
- Guthrie HD, Grimes RW, Hammon JM.** Changes in insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 in follicular fluid during atresia of follicles grown after ovulation in pigs. *J Reprod Fertil* 1995 ; 104 : 225-230.
- Hamilton GS, Lala PK.** Potential mechanism for enhancement of trophoblast invasion by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Biol Reprod* ; 54 : 130.
- Hannun YA.** « Sphingolipid-mediated signal transduction » 1997, Springer. ISBN 3-540-62714-6.



- Hartman ML, Vedhuis JD, Thorner MO.** Normal control of growth hormone secretion. *Hormone Research* 1993 ; 40 : 37-47.
- Heldin C-H, Purton M (Eds).** « Signal Transduction », Chapman and Hall.
- Henemyre C, Markoff E.** Decidualization and expression of insulin-like growth-factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-4 in the preimplantation embryo. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 801-806.
- Herrington AC, Ymer SI, Stevenson JL, Roupas P.** Growth hormone receptor/binding protein : physiology and function. *PSEBM* 1994 ; 206 : 238-242.
- Herrler A, Beier HM.** IGF-I binding in preimplantation rabbit embryos and their coverings. *J Reprod Fertil* 1995 ; 16 : 65.
- Herrler A, Einspanier R, Beier HM.** Binding of IGF-I to preimplantation rabbit embryos and their coats. *Theriogenology* 1997 ; 47 : 1595-1607.
- Hommel U, Harvey TS, Driscoll PC, Campbell ID.** Human epidermal growth factor : high resolution solution structure. *J Mol Biol* 1992 ; 227 : 271-282.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, et al.** A receptor pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996 ; 273 : 974-977.
- Hrabé de Angelis M, Grunker C, Viebahn C, Kirchner C.** bFGF prevents endoderm degeneration and induces mesoderm formation in rabbit blastocysts in a protein-free in vitro culture. *J Reprod Fertil* 1995 ; 16 : 8.
- Hua KM, Ord R, Kirk S, Li QJ, Hogkinson SC, Spencer GSG, Molan PC, Bass JJ.** Regulation of plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-I by nutrition and treatment with growth hormone in sheep. *J Endocrinol* 1992 ; 136 : 217-224.
- Huang E, Nocka KH, Buck J, Besmer P.** Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand : KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell* 1992 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Ikeda A, Matsumoto Y, Chang K-T, Nakano T, Matsuyama S, Yamanouchi K, Ohta A, Nishihara M, Tojo H, Sasaki F, Takahashi M.** Different female reproductive phenotypes determined by human growth hormone (hGH) levels in hGH-transgenic rats. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 847-851.
- Ilkbahar YN, Wu K, Thordarson G, Talamantes F.** Expression and distribution of messenger ribonucleic acid for growth hormone (GH) receptor and GH-binding protein in mice during pregnancy. *Endocrinology* 1995 ; 136 : 386-392.
- Im KS, Park KW.** Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 1995 ; 44 : 209-216.
- Ip NY, Stitt TN, Taplet P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, Grene LA, Barbacid M, Yancopoulos GD.** Similarities and differences in the way neurotrophins interacts with the trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron* 1993 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.



- Izadyar F, Colenbrabder B, Bevers MM.** Growth hormone stimulates in vitro bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development. *Theriogenology* 1996a ; 45 : 279.
- Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM.** In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol reprod devel* 1996b ; 45 : 372-377.
- Johnson GA, Austin KJ, Van Kirk EA, Hansen TR.** Pregnancy and interferon-tau induce conjugation of bovine ubiquitin cross-reactive protein to cytosolic uterine proteins. *Biol Reprod* 1998 ; 58(4) : 898-904.
- Juengel JL, Nett TM, Anthony RV, Niswender GD.** Effects of luteotrophic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insulin-like growth factor I and growth hormone receptor in the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1997 ; 110 : 291-298.
- Kahn CR, Smith RJ, Chin WW.** Mechanism of action of hormones that act at the cell surface. Dans Wilson JD, Foster DW (Eds) « Textbook of Endocrinology » 1992, W.B. Saunders Company, 91-134.
- Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM, Golueke P.** In vitro culture of bovine IVM-IVF embryos : cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology* 1994 ; 41 : 1323-1331.
- Kehrl JH.** Transforming growth factor beta : an important mediator of immunoregulation. *Int J Cell Cloning* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Kelly PA, Ali S, Rosakis M, Goujon I, Nagano M, Pelligrini I, Gould D, Djiane J, Ederly M, Finidory J, Postel-Vinay MC.** The growth hormone/prolactin receptor family. *Rec Prog Horm Res* 1993 ; 48 : 123-164.
- Khan-Dawood FS, Gargiulo AR, Dawood MY.** In vitro microdialysis of the ovine corpus luteum of pregnancy : effects of insulin-like growth factor on progesterone secretion. *Biol Reprod* 1994 ; 51 : 1299-1306.
- Kiefer MC, Stephans JC, Crawford K, Okino K, Barr PJ.** Ligand-affinity cloning and structure of a cell surface heparan proteoglycan that binds basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 1990 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Klagsbrun M, D'Amore PA.** Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokines and Growth Factor Reviews* 1996 ; 7 no 3 : 259-270.
- Kliem A, Fischer B.** A truncated form of the EGF-receptor is secreted in the porcine uterus. *J Reprod Fertil* 1997 ; 19 : 30-31.
- Kliem A, Tetens F, Niemann H, Fischer B.** Only a truncated epidermal growth factor receptor protein is present in porcine endometrium. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 1367-1371.
- Koos RD, Rocca MS, Pillai SB, Olson CE.** Inhibition of vascular endothelial growth factor action blocks estrogen-induced edema in the rat uterus. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 213.
- Laajoki L, Keniry M.** Molecular structure of Long-(Arg<sup>3</sup>)-IGF-I. *ANU reporter* 1999.



- Lands WEM (Ed).** « Biochemistry of arachidonic acid metabolism » 1989, ISBN 0-89838-717-5.
- Langford K, Nicolaides K, Miell JP.** Maternal and fetal Insulin-like growth factors and their binding proteins in the second and third trimesters of human pregnancy. *Hum reprod* 1998 ; 13 no 5 : 1389-1393.
- Le Cam A, Legraverend C.** Mode d'action de l'hormone de croissance. *Med Sci* 1993 ; 9 : 1352-1361.
- Lennard SN, Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F.** Expression of epidermal growth factor and its receptor in equine placental tissues. *J Reprod Fertil* 1998 ; 112 : 49-57.
- Li J, Tsang BK.** Regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in granulosa cells by transforming growth factors in vitro during follicular development. *Biol Reprod*; 54 : 57.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RML, Hardy K.** Role of maternal IGF-I in the development of the human preimplantation embryo. *J Reprod Fertil* 1997 ; 20 : 5.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RM, Hardy K.** Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in vitro fertilization culture. *Hum Reprod* 1998 ; 13(11) : 3144-3150.
- Lim JM, Hansel W.** Growth factors in development of bovine embryos cultured in a defined medium. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 127.
- Lindsey JS, Brenner RM.** Rhesus macaque endometrium expresses two novel transcripts of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 173.
- Liu SH, Ing NH, Bazer FW.** Three splice variants of keratinocyte growth factor receptor (KGFR) mRNA are expressed in the pig endometrium and fetal skin. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 102.
- Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, Darnell.** « Biologie Moléculaire de la Cellule » 1997, De Boeck Université s.a.. ISBN 2-7445-0001-1.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P.** Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 1420-1429.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M.** Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology* 1995 ; 44 : 109-118.
- Maes M, Maiter D, Massa G, Ketelslegers JM.** Récepteur et protéine de liaison de l'hormone de croissance : rôles dans la réceptivité cellulaire à l'hormone de croissance. *Ann Endocrinol-Paris* 1995 ; 56 : 253-257.
- Magoffin DA, Weitsman SR.** Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 1994 ; 51 : 766-775.
- Magoffin DA, Hubert-Leslie D, Zachow RJ.** Estradiol-17 $\beta$ , insulin-like growth factor-I, and luteinizing hormone inhibit secretion of transforming factor  $\beta$  by rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 1995 ; 53 : 627-635.



- Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, Birkett NC, Smith KA, Johnson MJ, Parker VP, Flores JC, Patel AC, Fisher EF, Erjavec HO, Herrera CJ, Wypych J, Sachdev RK, Pope J, Leslie I, Wen D, Lin CH, Cupples RL, Zsebo KM.** Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor dans. *Cell* 1990 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press
- Mason HD, Martikainen H, Beard RW, Anyaoku V, Franks S.** Direct gonadotrophic effect of growth hormone on oestradiol production by human granulosa cells in vitro. *J Endocrinol* 1990 ; 126 : 1-4.
- Massa G, Mulumba N, Ketelslegers JM, Maes M.** Initial characterization and sexual dimorphism of serum growth hormone-binding protein in adult rat. *Endocrinology* 1990 ; 126 : 1976-1980.
- Massagué J.** The transforming growth factor beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors », Oxford University Press.
- Massagué J, Pandiella A.** Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Matsunaga N, Goka T, Nam KT, Oda S, Ohneda A, Sasaki Y.** Inhibition of GH releasing factor (GRF)-induced GH secretion by intraruminal infusion of volatile fatty acids (VFA) in sheep. *Endocrine J* 1997 ; 44 : 133-140.
- Mau Y-HL, May JV.** Central role of mitogen-activated kinase (MAPK) kinase in theca cell transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) expression. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 230.
- McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM.** The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. Synergistic interaction with IL-7. *J Immunol* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Mellor SJ, Thomas EJ.** Interactions between oestradiol and epidermal growth factor in endometrial stromal proliferation and differentiation. *J Reprod Fertil* 1995 ; 104 : 157-164.
- Miyazawa K, Kitamura A, Naka D, Kitamura N.** An alternative processed mRNA generated from human hepatocyte growth factor gene. *Eur J Biochem* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Monget P.** Le système IGF dans l'ovaire de brebis. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences, Station INRA de physiologie de la reproduction de mammifères domestiques 1993, Tours, France.
- Morris DG, Grealy M, Sreenan JM.** Effect of immunization against synthetic peptide sequence of bovine inhibin  $\alpha$ -subunit on gonadotrophin concentrations in heifers. *An Reprod Sci* 1995 ; 38 : 63-71.



- Naka D, Ishii T, Yoshiyama Y, Miyazawa K, Hara H, Hishida T, Kitamura N.** Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J Bioch Chem* 1992 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A.** Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S.** Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM.** Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* 1992 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Neulen J, Yan Z, Weich HA, Bernart W, Breckwoldt M.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in luteinized human granulosa cells in vitro. *J Reprod Fertil* 1995 ; 16 : 31.
- Nicola NA (Ed).** « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Noël B, Bister JL, Botspoel N, Paquay R.** Effects of growth factors (IGF-I, EGF and TGF $\beta$ ) on steroidogenesis of entire dominant follicles in an in vitro perfusion system. *Europ J Physiol* 1994 ; 426 : R10-30.
- Noël B, Perrad B, Mandiki SNM, Bister JL, Paquay R.** Effects of IGF-I and EGF on steroidogenesis and sensitivity to LH-FSH of entire dominant follicles perfused in vitro. *3<sup>rd</sup> Conf Farm An Endocrinol* 1998a ; 71.
- Noël B, Perrad B, Mandiki SNM, Bister JL, Paquay R.** Effects of IGF-I on steroidogenesis and sensitivity to LH-FSH of entire dominant follicles prelevé during the anoestrus. *3<sup>rd</sup> Conf Farm An Endocrinol* 1998b ; 72.
- Nowak RA, Haimovici F, Biggers JD, Erbach GT.** Transforming growth factor  $\beta$  stimulates mouse blastocyst outgrowth through a mechanism involving parathyroid hormone-related protein. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 85-93.
- Palma GA, Müller M, Brem G.** Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil* 1997 ; 110 : 347-353.
- Palmieri SL, Stiles CD, Mercola M.** PDGF in the developing embryo. Dans Westermarck B, Sorg C (Eds), « Biology of platelet-derived growth factor. Cytokines », Karger ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.



- Parrott JA, Skinner MK.** Theca cell-granulosa cell interactions that induce primordial follicle development and promote folliculogenesis. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 125.
- Paul NL, Ruddle NH.** Lymphotoxin. *Ann Rev Immunol* 1988 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Pell JM, Saunders JC, Gilmour RS.** Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and of tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep. *Endocrinology* 1993 ; 132 : 1797-1807.
- Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI.** Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo : expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Perrad B, Noël B, Lagache F, Bister JL, Paquay R.** Effects of growth hormone administration on ovarian activity and hormonal secretions during the ovine estrous cycle. *Europ J Physiol* 1994 ; 43 : 325.
- Perrad B, Lagache F, Noël B, Bister JL, Paquay R.** Modification of ovarian follicular populations by exogenous growth hormone in ewes at different periods of the year. *Europ J Physiol* 1995 ; 430 : R8.
- Perrad B, Noël B, Demeuraux L, Bister JL, Paquay R.** Effects of growth hormone administered in vivo or in vitro on steroidogenesis of ovine ovarian follicles cultured in vitro. *Proc 13<sup>th</sup> Int Congress on An Reprod Sidney* 1996a ; 7-4.
- Perrad B, Noël B, Mandiki SNM, Bister JL, Paquay R.** Pretreatment with growth hormone in vivo modulates steroidogenesis of ovine ovarian follicles cultured in vitro in breeding season and anestrus. *J Reprod Fertil* 1996b ; 18 : 27.
- Perrad B, Noël B, Bister JL, Paquay R.** In vitro effects of ovine growth hormone (GH) on oocytes maturation, fecondation and cleavage. *3<sup>rd</sup> Conf Farm An Endocrino* 1998 ; 69.
- Perrad B.** Effets de l'hormone de croissance sur l'activité ovarienne chez la brebis. Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix 1998, Laboratoire de Physiologie Animale, Namur.
- Pescador N, Murphy BD.** IGF-I advances and EGF blocks StAR gene expression during luteinization of porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 212.
- Pong SS, Chaung LYP, Dean DC, Nargund RP, Patchett AA, Smith RG.** Identification of a new G-protein linked receptor for growth hormone secretagogues. *Mol Endocrinol* 1996 ; 10 : 57-61.
- Postel-Vinay MC, Kayser C, Bullier-Picard F, Clot JP.** Régulation des récepteurs et mécanismes d'action de l'hormone de croissance. *Reprod Nutr Dev* 1987 ; 27 : 513-520.



- Postel-Vinay MC, Finidori J, Sotripoulos A, Dinerstein H, Martini JF, Kelly PA.** Le récepteur de l'hormone de croissance. *Ann Endocrinol-Paris* 1995 ; 56 : 209-212.
- Postel-Vinay MC.** Growth hormone- and prolactin-binding proteins : soluble forms of receptors. *Horm res* 1996 ; 45 : 178-181.
- Rasmussen CA, Peschon J, Banerjee S, Hunt JS.** Role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in mouse placenta. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 153.
- Rath D, Niemann H, Tao T.** In vitro maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo yield in vitro. *Theriogenology* 1995 ; 44 : 529-538.
- Redmer DA, Kraft KC, Kirsch JD, Reynolds LP.** Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) in bovine and ovine adult and fetal organs. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 191.
- Reynolds TS, Wathes DC, Aitken RP, Wallace JM.** Expression of insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) in the pregnant ovine uterus. *J Reprod Fertil* 1997 ; 19 : 48-49.
- Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F.** The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle ovocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 1998 ; 112 : 123-130.
- Roberts AB, Sporn MB.** The transforming growth factor  $\beta$ s. Dans Sporn MB, Roberts AB (Eds), « Peptide growth factors and their receptors », Springer ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Roby KF, Hunt JS.** Myometrial tumor necrosis factor  $\alpha$  : cellular localization and regulation by estradiol and progesterone in the mouse. *Biol Reprod* 1995 ; 52 : 509-515.
- Rocca MS, Koos RD.** Expression of mRNA for keratinocyte growth factor (KGF) and its receptor (KGFR) in the mouse uterus. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 103.
- Roy SK, Carlson AM.** Gonadotropin regulation of transforming growth factor receptor gene expression in hamster ovarian follicles. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 203.
- Rubin JS, Chan AM-L, Bottaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wong J, Miki T, Finch PW, Aaronson SA.** A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Russ KD, Bolamba D, Harper SA, Sandler JL, Durrant BS.** Effects of epidermal growth factor and hormones on cumulus expansion and nuclear maturation of cultured dog oocytes. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 147.
- Sakumoto R, Sakabe Y, Kawate N, Okuda K.** Tumor necrosis factor  $\alpha$  receptors in bovine corpora lutea in the estrous cycle. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 79.
- Salli U, Bartol FF, Wiley AA, Tarleton BJ, Braden TD.** Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 77-83.



- Samathanam CA, Adesanya OO, Zhou J, Wang J, Bondy CA.** Fibroblast growth factors 1 and 2 in the primate uterus. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 491-496.
- Sargüea PE, Colman-Ierner AA, Lanuza GM, Fischman ML, Baranao JL.** Interactions between TGF $\beta$  and follistatin in granulosa cells. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 155.
- Schams D, Kamhuber M, Einspanier R.** Expression changes of growth factors, receptors and p 450- aromatase during recruitment, selection and dominance of bovine follicles. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 125.
- Schemm SR, Deaver DR, Griel LC, Muller LD.** Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biol Reprod* 1990 ; 42 : 815-821.
- Sharara FI, Bhartiya D, Nieman LK.** Growth hormone receptor gene expression in the mouse uterus modulation by gonadal steroids. *J Soc Gynecol Investig* 1994 ; 1(4) : 285-289.
- Silverman BL, Bettendorf M, Kaplan SL, Grumbach MM, Miller WL.** Regulation of growth hormone (GH) secretion by GH-releasing factor, somatostatin, and insulin-like growth factor-I in ovine fetal and neonatal pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 1989 ; 124 : 84-89.
- Singh B, Armstrong DT.** IGF-I, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to FSH in vitro. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 187.
- Sirotkin AV, Taradajnik TE, Makarevich AV, Bulla J.** Effect of follicular cells, IGF-1 and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. *An Reprod Sci* 1998 ; 51 : 333-344.
- Slayden OD, Rubin J, Lacey D, Brenner RM.** Keratinocyte growth factor (KGF) stimulates epithelial cell proliferation in the primate oviduct and vagina. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 103.
- Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW.** Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology* 1995a ; 136 : 4932-4944.
- Spencer TE, Ing NH, Ott TL, Mayes JS, Becker WC, Watson GH, Mirando MA, Brazier FW.** Intrauterine injection of ovine interferon-tau alters oestrogen receptor and oxytocin receptor expression in the endometrium of cyclic ewes. *J Mol Endocrinol* 1995b ; 15 : 203-220.
- Spencer TE, Bazer FW.** Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 1996 ; 137 : 1144-1147.
- Spencer TE, Mirando MA, Mayes JS, Watson GH, Ott TL, Bazer FW.** Effects of interferon-tau and progesterone on oestrogen-stimulates expression of receptors for oestrogen, progesterone and oxytocin in the endometrium of ovariectomized ewes. *Reprod Fertil Dev* 1996a ; 8 : 843-853.
- Spencer TE, Ott TL, Bazer FW.** Tau-interferon : pregnancy recognition signal in ruminants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996b ; 213 : 215-229.



- Spicer LJ, Klindt J, Buonomo FC, Maurer R, Yen JT, Echternkamp SE.** Effect of porcine somatotropin on number of granulosa cell luteinizing hormone/human gonadotropin receptors, oocyte viability, and concentrations of steroids and insulin-like growth factors I and II in follicular fluid of lean and obese gilts. *J Anim Sci* 1992 ; 70 : 3149-3157.
- Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW.** Genomic structure induction, and production of TNF $\alpha$ . Dans Aggarwal DR, Vilcek J (Eds), « Tumor necrosis factor structure, function, and mechanism of action », Marcel Dekker ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J.** Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Sugawara J, Kukaya T, Murakami T, Yoshida H, Yajima A.** Hepatocyte growth factor stimulates proliferation, migration, and lumen formation of human endometrial epithelial cells in vitro. *Biol Reprod* 1997 ; 57 : 936-942.
- Surveyor GA, Brigstock DR.** Localization of uterine connective tissue growth factor during early pregnancy in the mouse. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 118.
- Tanaka A, Miyamoto K, Minamino N, Takeda M, Sato B, Matsuo H, Matsumoto K.** Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 1992 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Tannetta DS, Fray MD, Wrathall JHM, Bleach ECL, Glencross RG, Knight PG.** Effects of supplementary treatment with bovine growth hormone on hormonal and ovulatory response to inhibin immunization in ewes. *J Reprod Fertil* 1997 ; 110 : 255-262.
- Teixeira MG, Austin KJ, Perry DJ, Dooley VD, Johnson GA, Francis BR, Hansen TR.** Bovine granulocyte chemotactic protein-2 is secreted by the endometrium in response to interferon-tau (IFN-tau). *Endocrine* 1997 ; 6 : 31-37.
- Tekpetey F, Singh B, Croy A, Armstrong D.** Localization of colony stimulating factor-1 (CSF-1) receptor (c-fms) in the pig ovary, and CSF-1 modulation of FSH and EGF-induced pig oocyte maturation. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 127.
- Testard J.** « L'œuf transparent » Flammarion (Ed) 1986. ISBN 2-08-081157-6.
- Testard J, Lassalle B.** La fécondation assistée. 1989 ; 245-251.
- Todd I, McElveen JE, Lamming GE.** Ovine trophoblast interferon enhances MHC class I expression by sheep endometrial cells. *J Reprod Immunol* 1998 ; 37(2) : 117-123.
- Tortora GJ, Grabowski SR (Eds).** « Principes d'anatomie et de physiologie » 1994, De Boeck Université, Canada : 984-1035. ISBN 2-8041-1024-9.
- Tremellen KP, Seamark RF, Robertson SA.** Seminal transforming growth factor  $\beta$ 1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 1217-1225.



- Ueno H, Gunn M, Dell K, Tseng A Jr, Williams LT.** A truncated form of fibroblast growth factor receptor 1 inhibits signal transduction by multiple types of fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem* 1992 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Uhm SJ, Chung HM, Seung KR, Kim NH, Lee HT, Chung KS.** Interactive effects of epidermal growth factor, transforming growth factor beta and gonadotropin on in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology* 1998 ; 49 : 319.
- Unemori EN, Erikson ME, Grove BH.** Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 176.
- Uzumcu M, Al-Homsi MF, Brigstock DR, Ayberk H, Coskun S, Jaroudi K, Hollanders JMG.** Immunohistochemical localization of connective tissue growth factor in human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 197.
- Van Den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF.** In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* 1997 ; 47 : 73-82.
- Vance M, Hartman ML, Thorner MO.** Growth hormone and nutrition. *Horm Res Suppl* 1992 ; 38 : 85-88.
- Ward SJ, Perks CP, Scaramuzzi RJ, Wathes DC.** Insulin-like growth factor-II (IGF-II) and aromatase mRNA expression in the ovary of ewes on high and low nutrition diets. *J Reprod Fertil* 1997 ; 19 : 60-61.
- Wehrenberg U, Rune GM.** Expression of TGF $\beta$  receptor type II during luteinization in marmoset ovaries : comparison of the cellular localization in vivo with hCG stimulated follicle cultures. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 147.
- Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeier W.** Scatter factor : molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. *J Cell Biol* 1990 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, Birchmeier W.** Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ, Park LS, Martin U, Mochizuki DY, Boswell HS, Burgess GS, Cosman D, Lyman SD.** Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1990 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Williams RH.** « Textbook of Endocrinology » 1994. Wilson JD, Foster DW (Eds), W.B. Saunders Company. ISBN 0-7216-9514-0.



- Winger QA, de los Rios P, Han VKM, Armstrong DT, Hill DJ, Watson AJ. Bovine oviducal and embryonic insulin-like growth factor-binding proteins : possible regulators of « embryotrophic » insulin-like growth factor circuits. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 1415-1423.
- Woad KJ, Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Bramley TA, Web R. Expression of insulin-like growth factor-binding protein-2, -3 and -4 mRNA in the bovine corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1997 ; 20 : 16.
- Wuu Y-D, Pampfer S, Vanderheyden I, Lee K-H, De Hertogh R. Impact of tumour necrosis factor  $\alpha$  on mouse embryonic stem cells. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 1416-1424.
- Wuu Y-D, Pampfer S, Becquet P, Vanderheyden I, Lee K-H, De Hertog R. Tumor necrosis factor  $\alpha$  decreases the viability of mouse blastocysts in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 479-483.
- Xiao CW, Murphy BD, Sirois J, Goff AK. Down-regulation of oxytocin-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase expression by interferon-tau in bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 656-663.
- Yamashita S, Weiss M, Melemd S. Insulin-like growth factor I regulates growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels in human pituitary tumor cells. *J Clin Endocr Metab* 1986 ; 63 : 730-735.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Ymer SI, Herington AC. Evidence for the specific binding of growth hormone to a receptor-like protein in rabbit serum. *Mol Cell Endocrinol* 1985 ; 41 : 153-161.
- Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu S, Iwashita M, Adachi T, Sueoka K, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M. Effects of insulin-like growth factor I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. *Biol reprod* 1996 ; 55 : 152-160.
- Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF-binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Dom An Endocrinol* 1998 ; 15(1) : 55-63.
- Zhao Y, Rong H, Chegini N. Expression and selective cellular localisation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF  $\alpha$  and  $\beta$  receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue. *Biol Reprod* 1995 ; 53 : 923-930.
- Zhao Y, Burbach JA, Roby KF, Terranova PF, Brannian JD. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the porcine corpus luteum. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 1385-1391.



- Zhaoping G, Whitney CN, Char EF, John EG.** Protein concentration of IGF-I, IGFBPs 2-5 and IGF-type I receptor (IGF-IR) in porcine corpora lutea. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 218.
- Zheng J, Bird IM, Magness RR.** Basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF) elevate mRNA levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in ovine feto-placental artery endothelial cells. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 148.
- Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA, Kakare SB, Sachdev RK, Yuschenkoff VN, Birkett NC, Williams LR, Satyagal VS, Tung W, Bosselman RA, Mediaz EA, Langley KE.** Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 1990 ; cité dans Nicola AN (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.